



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/53, 15/54, 15/82, 9/10, 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08169 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05467

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 35 219.0	5. August 1998 (05.08.98)	DE
198 45 216.0	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE
198 45 231.4	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE
198 45 224.1	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE

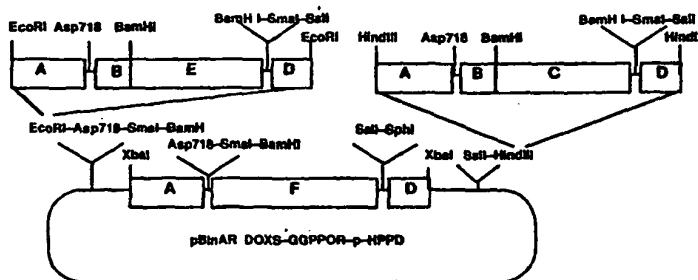
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SUN-
GENE GMBH & CO.KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3,
D-06468 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REINDL, Andreas
[DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134
Birkenheide (DE). LEON MEJIA, Patricia [MX/MX];
Gonzalo de Sandoval 226, Cuernavaca, Morelos 62250
(MX). ESTEVES PALMAS, Juan Manuel [MX/MX];
Entrada a Ojo de Agua Col., Loma Bonita Tecamac Estado
(MX). CANTERO GRACIA, Maria Araceli [MX/MX]; 2da
Privad Los Pinos 22, Loma Bonita Cuernavaca, Morelos
62210 (MX). EBNETH, Marcus [DE/DE]; Münzerbert 25,
D-06486 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE];
Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).(74) Anwalt: LANGFINGER, Klaus-Dieter, BASF Aktienge-
sellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ,
GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX,
NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA,
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.(54) Title: DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUC-
TION THEREOF IN PLANTS(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT SYNTHASE UND DEREN
ÜBERPRODUKTION IN PFLANZENBinärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli, des
GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana und des HPPD-Gens aus Strep-
tomyces avermitilis in den Plastiden transgener Pflanzen.BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSION THE DOXS-GENE FROM E. COLL
THE GGPPOR GENE FROM ARABIDOPSIS THALIANA AND THE HPPD GENE
FROM STREPTOMYCES AVERMITILIS IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS

(57) Abstract

Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-de-
oxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from Arabidopsis or E. coli.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis bzw. E. coli.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05467

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N9/04
C12Q1/02 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LANGE B M ET AL: "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2100-4. , XP002116672 in der Anmeldung erwähnt	1,2,9, 13,17,18
Y	siehe insbesondere den letzten Absatz	20,21
X	MANDEL A. ET AL.: "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution" PLANT JOURNAL, Bd. 9, Nr. 5, 1996, Seiten 649-658, XP002122907 das ganze Dokument	22

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. November 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/12/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1998)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05467

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24. Juli 1996 (1996-07-24) Seite 3, Zeile 35-54	20,21
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31. Juli 1997 (1997-07-31) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-22
A	WO 98 06862 A (SHEWMAKER CHRISTINE K ;CALGENE INC (US)) 19. Februar 1998 (1998-02-19) das ganze Dokument	1-22
A	LOIS L M ET AL: "Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2105-10. , XP002116673 das ganze Dokument	1-22
A	SPRENGER G A ET AL: "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 NOV 25) 94 (24) 12857-62. , XP002116674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-22
A	KELLER ET AL: "metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis - evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,DE,BERLIN, Bd. 251, Nr. 1/02, Seite 413-417-417 XP002100518 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-22
P,X	WO 99 11757 A (MCCASKILL DAVID G ;LANGE BERND M (US); UNIV WASHINGTON (US); WILDU) 11. März 1999 (1999-03-11) siehe insbesondere S.14 Z.29 bis S.15 Z.21	1,2,9, 13,17-22

1

-/-

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

Seit 2 von 3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05467

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	DE 197 52 700 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 2. Juni 1999 (1999-06-02) siehe insbesondere S.6 Z.20 ff.; Beispiel 6	20,21
E	WO 99 52938 A (HASSAN JOMAA) 21. Oktober 1999 (1999-10-21) das ganze Dokument	18-22

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05467

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0723017 A	24-07-1996	DE 19501906 A CA 2167768 A US 5912169 A US 5925535 A	25-07-1996 24-07-1996 15-06-1999 20-07-1999
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A EP 0877793 A JP 11510708 T	20-08-1997 18-11-1998 21-09-1999
WO 9806862 A	19-02-1998	AU 4058497 A CN 1227609 A EP 0925366 A	06-03-1998 01-09-1999 30-06-1999
WO 9911757 A	11-03-1999	AU 8925898 A	22-03-1999
DE 19752700 A	02-06-1999	DE 29800547 U JP 11169186 A	08-04-1999 29-06-1999
WO 9952938 A	21-10-1999	DE 19825585 A WO 9952515 A	21-10-1999 21-10-1999

Formblatt PCT/BA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation n ⁷ : C12N 15/53, 15/54, 15/82, 9/10, 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08169
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05467		(74) Anwalt: LANGFINGER, Klaus-Dieter; BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99)			
(30) Prioritätsdaten:		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
198 35 219.0 5. August 1998 (05.08.98) DE 198 45 216.0 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE 198 45 231.4 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE 198 45 224.1 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SUN-GENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06468 Gatersleben (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). MEJIA, Patricia Leon [MX/MX]; Ganzalo de Sandoval 226, Cuernavaca, Morelos 62250 (MX). PALMAS, Juan Manuel Esteves [MX/MX]; Entrada a Ojo de Agua Col., Loma Bonita Tecamac Estado (MX). GRACIA, Maria Araceli Canter [MX/MX]; 2da Privad Los Pinos 22, Loma Bonita Cuernavaca, Morelos 62210 (MX). EBNETH, Marcus [DE/DE]; Bicklingerweg 16, D-06486 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).			
(54) Title: DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS			
(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT SYNTHASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN			
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus <i>E. coli</i> , des GGPPOR-Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und des HPPD-Gens aus <i>Streptomyces avermitilis</i> in den Plastiden transgener Pflanzen.			
BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSING THE DOXS-GENE FROM <i>E. COLI</i> , THE GGPPOR GENE FROM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> AND THE HPPD GENE FROM <i>STREPTOMYCES AVERMITILIS</i> IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS			
(57) Abstract			
Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from <i>Arabidopsis</i> or <i>E. coli</i> .			

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis bzw. E. coli.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen

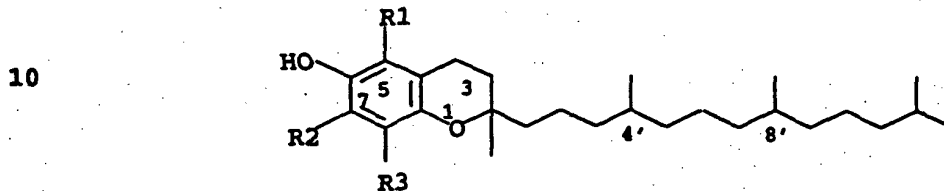
5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-,
10 Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
15 kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
20 kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3,
25 einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphe-
nylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit
30 erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3;
35 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, die derart hergestellten Pflanzen selbst, sowie die Verwendung der
SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems
40 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch
45 auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

2

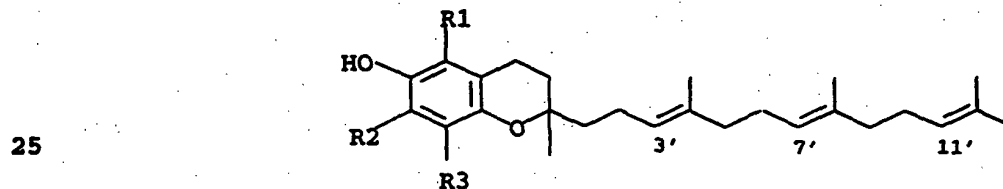
Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):



15

- 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

20



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

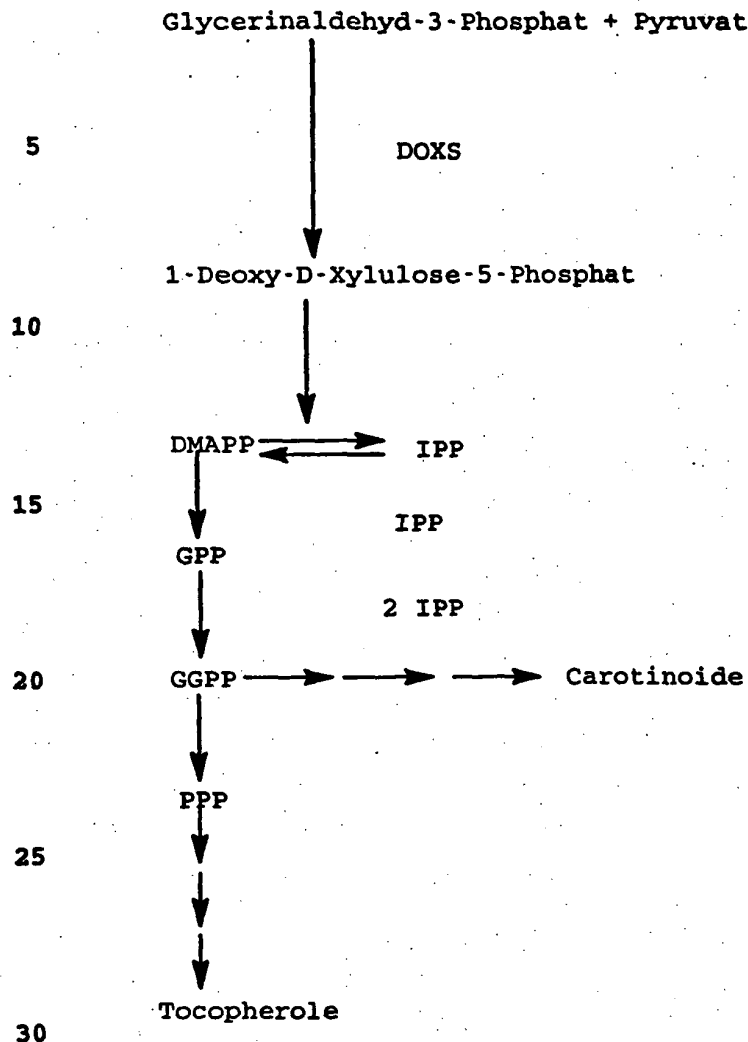
35

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Tocopherol Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthesegen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C₅-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. Carotinoide) bestehen aus C-Skeletten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C₅), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit C¹³ gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1), 129-134 (1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(5), 2100-2104 (1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 271-274 (1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59(1983), 50-60. Der Mevalonat-

unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyl-lipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).

- 5 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C₁₀) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C₁₅) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytanyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

15

- Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

- In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4), 589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996).

- Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch

verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens in den Pflanzen.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Organismus der selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines heterologen Gens (Gens aus entfernten Organismen) erreicht werden. Nukleotidsequenzen sind aus *Arabidopsis thaliana* DOXS (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel 1 wird das DOXS-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ-ID No.:1; Mandel et al, Plant J. 9, 649-658(1996); Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltene Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen kodiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen wie zum Beispiel *E. coli* (SEQ-ID No. 3) bzw. vorzugsweise aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

35

Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsammel-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurückführen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, Trends in Plant Sciences 1; 21-26(1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase defekte *Arabidopsis thaliana* Mutante isoliert, die einen "Albino-Phänotyp" zeigt (Mandel et al, 1996).

Daraus ist abzuleiten, daß eine verringerte Menge an Carotinoiden in den Plastiden negative Auswirkungen auf die Pflanze hat.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines
5 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines
p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens in den Pflanzen,
siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isopre-
10 noid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide er-
höht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen
die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli
erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer hetero-
15 loger Gene erreicht werden.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-
5-Phosphat wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide
umgesetzt.

20

Darüberhinaus verstärkt die Bildung von Homogentisinsäure den
Metabolitfluß weiter in Richtung von Phytylquinonen und damit
Tocopherol, siehe Abbildung 1. Homogentisinsäure wird gebildet
aus p-Hydroxyphenylpyruvat durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat
25 Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden
aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganis-
men, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 11 wurde erstmals das HPPD-Gen aus Strep-
30 tomyces avermitilis (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994),
5312-5319; SEQ-ID No. 5) zusammen mit der DOXS aus E.coli SEQ-ID
No. 3 in Pflanzen und pflanzlichen Plastiden überexprimiert.

Die Erhöhung der plastidären IPP Bildung führt zur verstärkten
35 Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung
von Homogentisinsäure gewährleistet, daß genügend Substrat für
die Bildung von Tocopherolen in den Plastiden zur Verfügung
steht. Dieses nun vermehrt zur Verfügung stehende Homogentisat
kann in den transgenen Pflanzen seinerseits mit der durch die
40 Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP)
umgesetzt werden. PPP nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da
es einerseits als Ausgangssubstrat für Chlorophylle und Phyllo-
quinone, andererseits für Tocopherole dient.

45 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transforma-
tion der Pflanzen mit einem das DOXS- und das HPPD-Gen ent-
haltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

- Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5, die für eine DOXS bzw. HPPD oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. HPPD kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.
- 15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 20 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. HPPD-Gen operativ verknüpft sind.
- 25 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. HPPD DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 35 (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 40 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des 45 DOXS- bzw. HPPD-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. HPPD-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK)

oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

- 5 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen und ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der
- 15 Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze

- 20 erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans-
- 25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen,
- 30 Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 35
- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in
 - 40 eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
 - 45 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vita-

10

min K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer HPPD DNA-Sequenz in Pflanzen.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines
5 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
10 allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Raps-pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer
15 heterologer Gene erreicht werden.

Um das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des En-
20 zyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

25

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenen Pflanzen verstärkt expri-
miert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch
30 geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus
35 Arabidopsis thaliana beschrieben.

Die Erhöhung der plastidären 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und Phytylpyrophosphat Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide, so daß genügend Substrat für die Bildung
40 von Tocopherolen, Chlorophyllen, Vitamin K und Phylloquinonen in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS- und das GGPPOR-Gen ent-
45 haltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

11

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen
 5 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 die für eine DOXS bzw. GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Inser-
 10 tion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am
 20 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes
 25 der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellular-
 30 laren Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

35

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin

40 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- 45 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

12

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gen Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

13

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen bzw. ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

25

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen

zen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- 5 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer GGPPOR DNA-Sequenz in Pflanzen.

10 Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens, eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens und eines Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

- 15 Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen
20 die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann auch durch Expression homologer oder anderer heterologer DOXS-Gene - wie zum Beispiel einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 - erreicht werden.

- 25 Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Geranylgeranylpyrophosphat umgesetzt.

- Um das vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren
30 erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von
35 Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

- Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert.
40 Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

15

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende PPP in Richtung Toco-
5 pherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren
erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des En-
zyms p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) durch Über-
expression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens
gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von
10 Homogentisinsäure durch verstärkte Umsetzung von Hydroxyphenylpy-
ruvat in Homogentisinsäure erreicht.

cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen
Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen
15 und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 10 wird die Klonierung des HPPD-Gens aus
Streptomyces avermitilis beschrieben (Denoya et al., J. Bacte-
riol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 5). Um eine Plastidenloka-
20 lisation zu gewährleisten ist der HPPD aus *Streptomyces* eine
Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expres-
sionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein HPPD-Gen codiert,
das mit SEQ-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen
bzw. aus Pflanzen stammt.

25 Die Erhöhung der plastidären D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat, der
Phytilypyrophosphat und der Homogentisinsäure Bildung führt zur
verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte
Bereitstellung dieser Vorstufen gewährleistet, daß genügend Sub-
30 strat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophylle, Vitamin K
und Phylloquinone in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen erfolgt
durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-, das HPPD-
35 Gen und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt (Beispiel 17). Als
Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K,
Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen
40 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7,
die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR oder deren funktio-
nelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit er-
höhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-
Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder
45 cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette
geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, di

für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-, das HPPD- bzw. das GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

25

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin

30 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopalinsynthase-Promotor
- 35 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des

eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-, HPPD-, bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent die-

ses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Unter-
einheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) ab-
geleitet ist.

5 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für
ein DOXS-Gen, ein HPPD-Gen und ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen
Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agro-
bacterium tumefaciens zu transformieren.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung
einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1
oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen
hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen,
-zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der
15 Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll-
und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch
in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze er-
20 folgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie
deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Ge-
genstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans-
25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz
SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7
oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene
Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Beson-
ders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. G r-
30 ste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zucker-
rübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, To-
mate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und
Weinspezies.

35 Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn-
zeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-
Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, eine DNA-Sequenz
40 SEQ-ID No. 5 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit die-
sen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in
Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflan-
zen einbringt.
- 45 - Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3,
SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende
DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanz n mit erhöhtem Toco-

pherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.

- 5 Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

- Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines DOXS-Gens
10 aus Arabidopsis oder E. coli bzw. damit hybridisierende DNA-Sequenzen und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der DOXS-Enzymaktivität.

- Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transforma-
15 tion der Pflanzen mit einem das DOXS-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Arabidopsis und Raps eingesetzt.

- 20 Die Klonierung des vollständigen DOXS-Gens aus Arabidopsis erfolgt über die Isolierung der für das DOXS-Gen spezifischen cDNA (SEQ-ID No. 1).

- Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ
25 ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 die für eine DOXS oder deren funktionelles Äquivalent kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette
30 geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

- Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in
35 der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere
40 regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen
45 Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen

sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsver-
 5 stärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb.
 10 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - 15 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.
- 20 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzen-
 25 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),
 30 2195 - 2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert wer-
 35 den kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein
 40 durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
 45 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische

Expression gewährleistet. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

- 5 Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise
10 einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al. Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau einer derartigen
15 tigen Kassette ist in der Abbildung 2 schematisch beispielhaft dargestellt.

- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-DNA Sequenz
20 und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning:
25 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing
30 Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen
35 entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant
40 Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

- Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des
45 Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abge-

spalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanz sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffül-

23

len von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das
5 Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und
10 tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-
15 Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

20 Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

25 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien
30 können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von
35 Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke
40 können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS
45 kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise

Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

5

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a.

- 10 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung
15 einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende DNA-Se-
20 quenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -gewebe oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

- 25 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

35

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen
40 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion
45 und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering

25

and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205 - 225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor
5 kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können
10 ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem
15 verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz
20 noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

25

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen,
30 Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere
35 Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren
40 Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise
45 der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-

setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

- 10 Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

20

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.

- 25 Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

- Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

- 40 Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen,
5 transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die
Sequenz SEQ-ID No.1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID
No. 3 und SEQ-No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID
No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und
SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende
10 DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermeh-
rungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei
transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais,
Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume,
Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und
15 die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen
oder Algen.

20 Um effiziente Hemmstoffe der DOXS finden zu können, ist es
notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-
Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu
stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz
der DOXS aus Arabidopsis in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen)
25 kloniert und in *E. coli* überexprimiert.

Das mit Hilfe der Expressionskassette exprimierte DOXS-Protein
eignet sich besonders zur Auffindung von für die DOXS spezifi-
schen Hemmstoffen.

30

Dazu kann die DOXS beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt
werden, bei dem die Aktivität der DOXS in An- und Abwesenheit
des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich
der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und
35 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden
Wirkstoffes machen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung der DOXS
sind beschrieben (Putra et. al., Tetrahedron Letters 39 (1998),
23-26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857-12862).

40 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl
von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf hemmende
Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es,
reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt
solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substan-
45 zen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige verti fte
Prüfungen durchzuführen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ-ID N . 1 oder SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 10 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 15 - Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.
- 20 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA Sequenz.
- 25 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 30 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

35

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

40

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1

Herstellung der *Arabidopsis thaliana* DOXS-Transformationskonstrukte

Das *Arabidopsis thaliana* DOXS Gen wurde wie in Mandel et al. (1996) beschrieben als vollständige cDNA in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene) kloniert.

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurde ein 2.3 kb Fragment (mit F-23-C bezeichnet) über die pBluescript KS- HincII (blunt-end) und SacI Schnittstellen isoliert. Diese Sequenz enthält die vollständige DOXS-cDNA inklusive Chloroplastentransitpeptid vom ATG-Startcodons bis zu einer EcoRI-Schnittstelle, die 80 bp stromabwärts des Stopcodons liegt. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen SmaI (blunt-end) und SacI in den pBIN 19 3X35S Vektor (Abbildung 3) kloniert (Bevan et al., 1980), der den 35S Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (Franck et al., Cell 21(1), 285-294 (1980)) dreimal hintereinander angeordnet enthält.

Zur Herstellung von Antisense-Konstrukten wurde ein Bereich des 3'-Endes der cDNA (mit F-23-C Antisense bezeichnet) in den oben erwähnten pBIN19-3X35S-Vektor kloniert. Ein Teil des 5'-Bereichs der DOXS-cDNA in pBluescript KS- wurde über HincII und die DOXS-

30

interne BglII Schnittstelle verdaut und das entstandene Fragment entfernt. (Abbildung 4). Die BglII-Schnittstelle wurde über die Klenow-fill-in Reaktion (Klenow-Polymerase; Roche; nach Reaktion nach Herstellerprotokoll) aufgefüllt, so daß ein "blunt-end" ent-
 5 steht. Die nun kompatiblen Enden (BglII-"blunt-end" und HincIII wurden ligiert. Nun wurde der 3'-Bereich der DOXS-cDNA über KpnI und XbaI (beide Schnittstellen liegen im Polylinker von pBluescript KS-5'- und 3'- der DOXS-cDNA) in Antisense-Orientierung in den oben beschriebenen pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung
 10 kloniert.

Die Transformationen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit *Agrobacterium tumefaciens* mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science
 15 265 (1994), 1856-1860). Mehrere unabhängige Transformanten wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transformierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo-oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt,
 20 um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

25

Tabelle 1. Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

	LINIEN	SEGREGATION
30	A9	75%
	A19	100%
	B11	75%
	B4	100%
35	C2	100%
	D3	75%
	D17	100%
	E9	75%
	E14	100%
40	F9	75%
	F14	100%

45

Beispiel 2

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums Escherichia coli XL1 Blue

- 5 Eine Kultur von Escherichia coli XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert
- 10 wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-
- 15 Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei
- 20 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

25

Beispiel 3

Isolierung der DOXS aus E. coli

- 30 Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktionschnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3'
- 35 (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem
- 40 Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

45

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;

32

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

30

Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Dabei wurden zwei nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

40

Beispiel 4

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

45 Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20

33

(1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abbildung 7).

5 Beispiel 5

Nachweis erhöhter DOXS-Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamtprotein (Abbildung 8) aus 15 Tage alten Keimlingen

10 verschiedener, unabhängiger transgener Pflanzen, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde isoliert und mit einem polyklonalen Anti-DOXS-Antikörper (IgG) in einer Westernanalyse detektiert (Abbildung 9).

15 Beispiel 6

Messung des Carotinoid- und Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllmengen wurde
20 wie in Lichtenthaler und Wellburn (1983) beschrieben mit 100% Acetonextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen der transgenen Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

25 Tabelle 2: Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllgehalt der transgenen DOXS-Linien

	LINIE	% GESAMT CHLORO-PHYLLE	% GESAMT CAROTINOIDE
30	clal Mutante	5	5
	Wild Typ	100	100
	B-4	86	89
	B-11	84	90
35	C-2	98	107
	D-3	128	135
	D-17	136	149
	E-14	121	139
40	F-7	80	90
	F-14	85	107

45

Beispiel 7

Transformation von Raps

- 5 Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, JB und Damm, B (in Gene, Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien angegeben sind. Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clontech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCR-Terminatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70 % (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

- Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in LB mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt.

- 35 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-

35

fernt. Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explanten in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 1) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

Beispiel 9

Nachweis der Expression der DOXS aus E. coli in transgenen Tabakpflanzen

Von Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR HPPD-DOXS enthielten, wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 0,9 cm aus völlig entfalteten Blättern genommen und in flüssig Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in einem HEPES-KOH-Puffer, der Protease-Inhibitoren enthielt homogenisiert und aus dem Extrakt mit dem Protein-Assay von Bio-Rad nach Herstellerangaben die Proteinkonzentration bestimmt. 45 µg Protein wurden von jedem Extrakt mit einem Volumen Auftragspuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf einem 12,5 prozentigen SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine mittels Semi-dry Elektrobots auf Porablotmembran (Machery und Nagel) übertragen. Die Detektion des DOXS-Proteins erfolgte mittels eines Antikörpers gegen die E. coli DOXS aus Kaninchen. Die Farbreaktion basiert auf der Bindung eines sekundären Antikörpers und einer alkalischen Phosphatase, die NBT/BCIP zu einem Farbstoff umsetzt. Sekundärer Antikörper und alkalische

36

Phosphatase stammen von Pierce, die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Abbildung 10 zeigt den Nachweis des DOXS-Proteins in Blättern 5 transgener Pflanzen. 1: Marker; 2: Pflanze 10; 3: 62; 4: 63; 5: 69; 7: 71; 8: 112; 9: 113; 10: 116; 11: WT1; 12: WT2; 13: 100 ng rekombinantes Protein; 14: 50 ng rekombinantes Protein; 15: 10 ng rekombinantes Protein.

10 Beispiel 10

Klonierung des Gens einer HPPD aus *Streptomyces avermitilis* U11864

15 Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Streptomyces avermitilis* U11864:

Eine Kultur von *Streptomyces avermitilis* U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für 20 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/ 25 Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Unter-tisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die 30 Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volu- 35 men 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al, 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligo- 40 nukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA-CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die 45 Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

37

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlag wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

- 5 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C
- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C
- 25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

- Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)
- 10 gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin),
 - 15 vor dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

- Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor
- 20 hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch
 - 25 zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984),
- 35 835-846) zur Transkriptionstermination.

Beispiel 11

- Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS
- 40 und HPPD-DNA-Sequenzen

- Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 13). Die Gensequenzen der DOXS
- 45 und der HPPD wurden jeweils als BamHI-Fragmente wie in Beispiel 3 und 10 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungs-

signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Der pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCCGCGCCGCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stop-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

20

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min

25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

25 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-HPPD (Abbildung 12).

35 Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und
40 den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors (kursiv geschrieben) anlagert, lautet 5'-ATAAGCTTCATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert
45 lautet 5'-ATAAGCTTGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script

(Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 5). Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAA-CGGA-G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984) übertragen.

Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, der wie oben beschrieben bereits die Sequenz der HPPD enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-HPPD-DOXS (Abbildung 13), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS.

Beispiel 12

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen
(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DOXS und der HPPD transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert,

der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant* (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtylelessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

15 Beispiel 13

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

25

Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium tumefaciens Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS und der HPPD verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

41

- Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt.
- 10 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

- Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

35

Beispiel 14

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

- 40 Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der HPPD (SEQ-ID No. 5) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen

Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

Beispiel 15

5

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*

Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfalteten Blättern von *Arabidopsis thaliana*:

10

Voll entfaltete Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidinium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die

- 15 Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt.
- 20 Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

- 25 Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von *A. thaliana*:

- 20 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M Natriumacetat-lösung und 2 µl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 µl
- 30 Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl RNase freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA aus
- 35 dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.

- Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur.J.Biochem. (1998) 251(1-2), 413-417); Accession Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine Sali Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGGCGACGACGGTTACTC-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das
- 45 Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGACGTGATGA-

TAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stratagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

- 5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min
- 10 5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min
- 25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ ID No. 7). Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restriktionsschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionstermination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, sollte das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert werden. Das Konstrukt ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

- 30 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur
- 35 Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 16

- 40 Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und GGPPOR Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die GGPPOR sind wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 15). Das GGPPOR-Gen mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz wurde (wie in Beispiel 15 beschrieben) als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend

geschnittenen Vektor pBinAR-Hyg kloniert. Das Gen der DOXS wurde als BamHI-Fragment wie in Beispiel 3 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Dieses Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

- 10 Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
 15 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend
 25 geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Res. 12 (1984), 8711-8721) übertragen.

- Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA
 30 des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-
 35 GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH,
 40 Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR (Abbildung
 45 15), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

45

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment D
 5 enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

10 Beispiel 17

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS-, GGPPOR- und HPPD-DNA-Sequenzen

15 Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS, die GGPPOR und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der alle drei Gensequenzen enthält (Abbildung 16). Das GGPPOR-Gen war mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz versehen (wie in Beispiel 15 beschrieben). Der verwendete pBinAR-Hyg Vek-
 20 tor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine
 25 andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das
 30 Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-CCGCGCGCGCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stopp-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase von Promega GmbH, Mannheim nach Herstellerangaben. Als
 35 Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min
 5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
 40 25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz
 45 wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das

Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-p-HPPD.

- 5 Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das p-HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al. 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und
10 den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors anlagert (kursiv geschrieben) lautet 5'-ATAAGCTT-CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert
15 lautet 5'-ATAAGCTTGGAC-AATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus diesem PCR-Script-Vektor
20 wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

- Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
25 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH,
30 Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der HPPD enthielt.
40

- Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle
45 angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den

47

Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde
5 mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen,
10 gen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenzen der HPPD und der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR-HPPD (Abbildung 16), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

- 15 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids
20 pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 18

25

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

- Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter
30 Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt
35 der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

Beispiel 19

40

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

- Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3), der HPPD (SEQ-ID No. 5) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen
45 und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen

zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
4. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
5. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
6. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
7. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und codierend für ein Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Her-

stellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

8. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3,
5 einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von
10 Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
9. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhte Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt,
15 dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
10. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt,
20 dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
- 25 11. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit
30 diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
12. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt,
35 dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
13. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen
40 Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
- 45 14. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und

SEQ-ID No. 5 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

15. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
16. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
17. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 13-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
18. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 13-16.
19. Pflanze nach Anspruch, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
20. Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
21. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 13 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
22. Verwendung einer Pflanze enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung pflanzlicher und bakterieller DOXS.

Abbildung 1

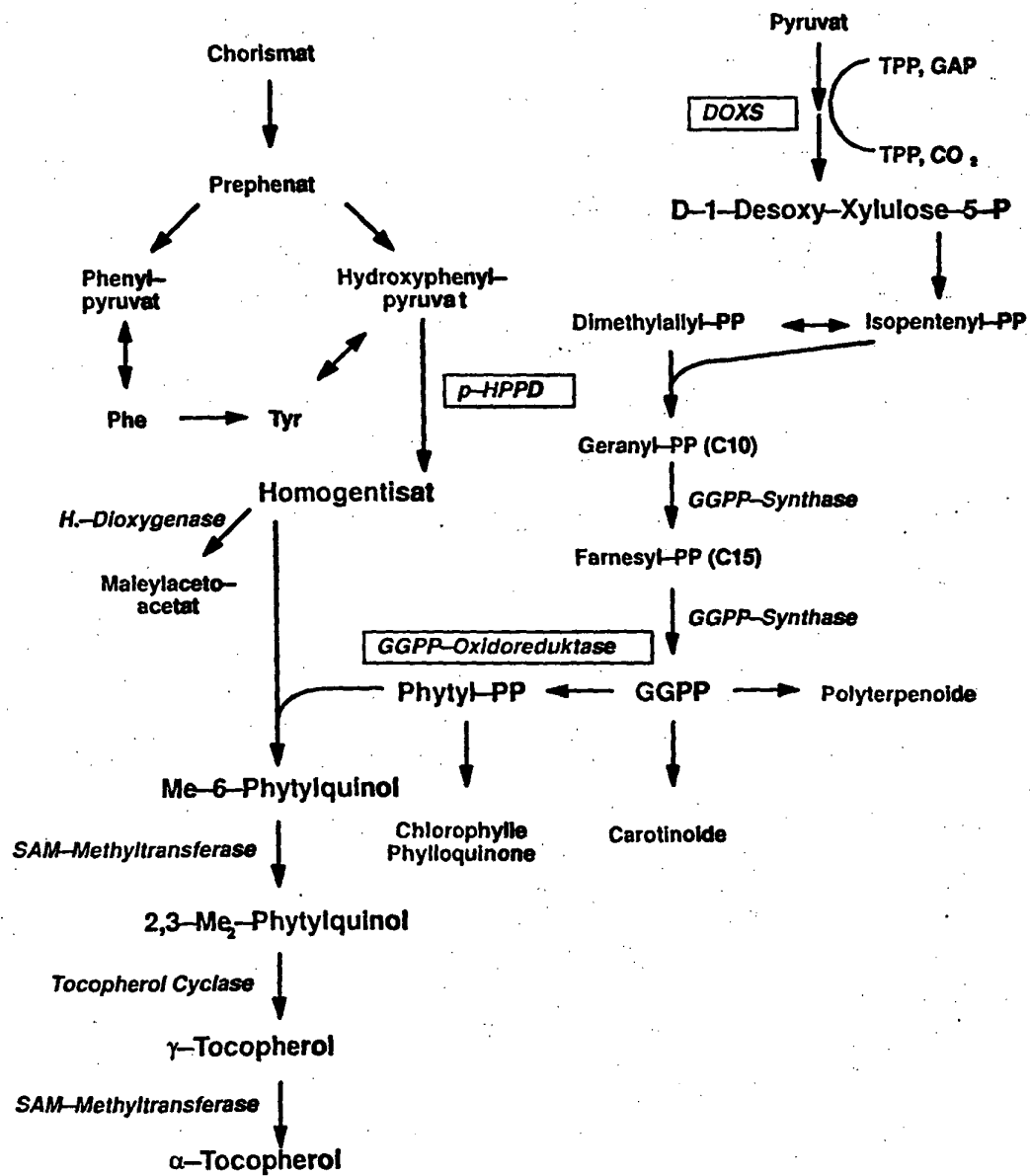
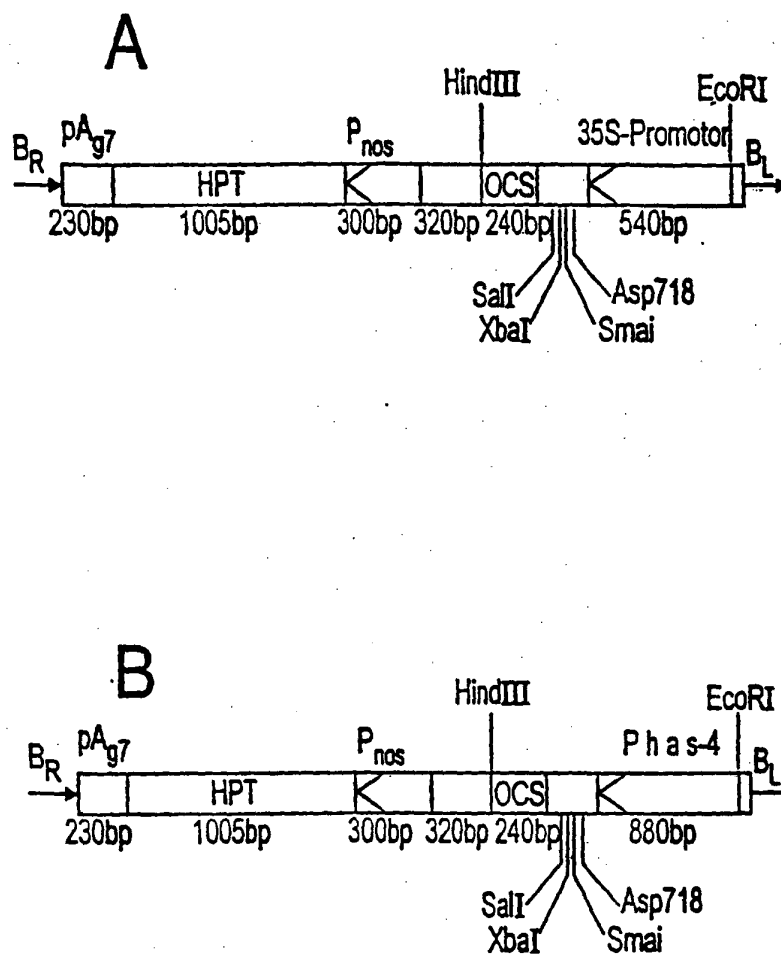


Abbildung 2



pBin19-3X 35S-F-23-C (Sense)

Abbildung 3

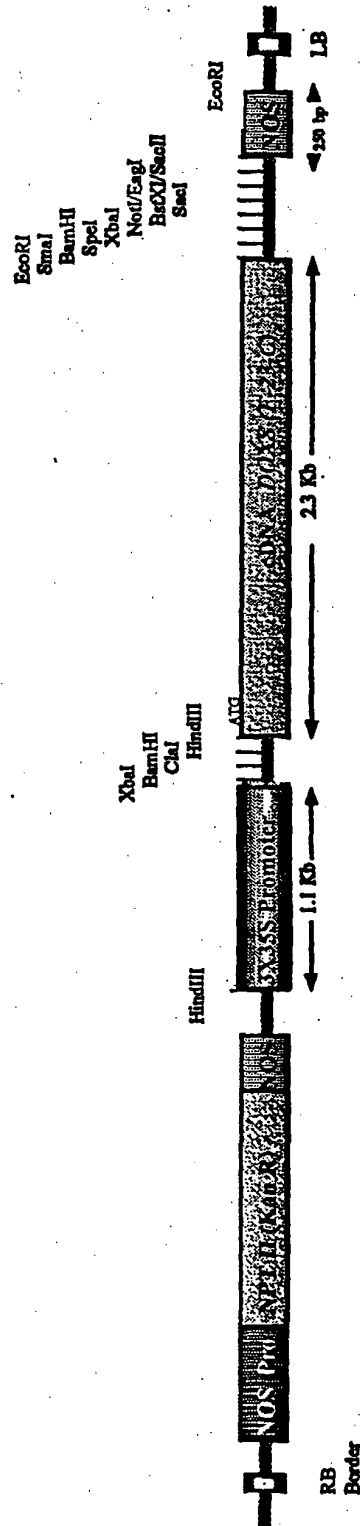


Abbildung 4

pBin19-3X35S-DOXS (Antisense)

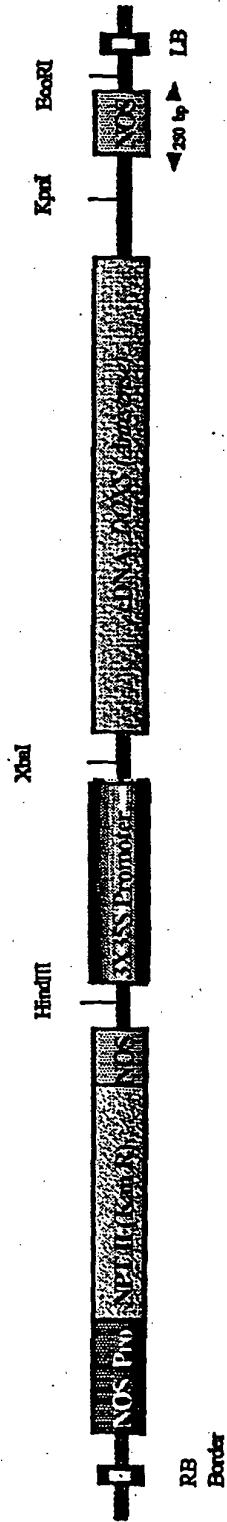
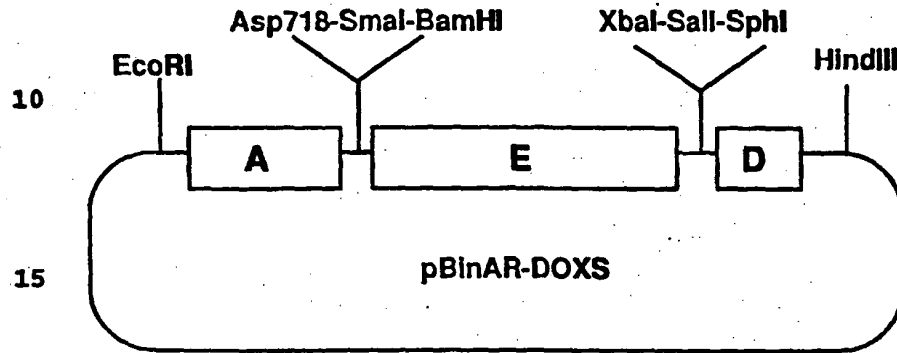


Abbildung 5

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E.coli im
5 Zytosol transgener Pflanzen



20 Abbildung 6

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli in
Plastiden transgener Pflanzen.

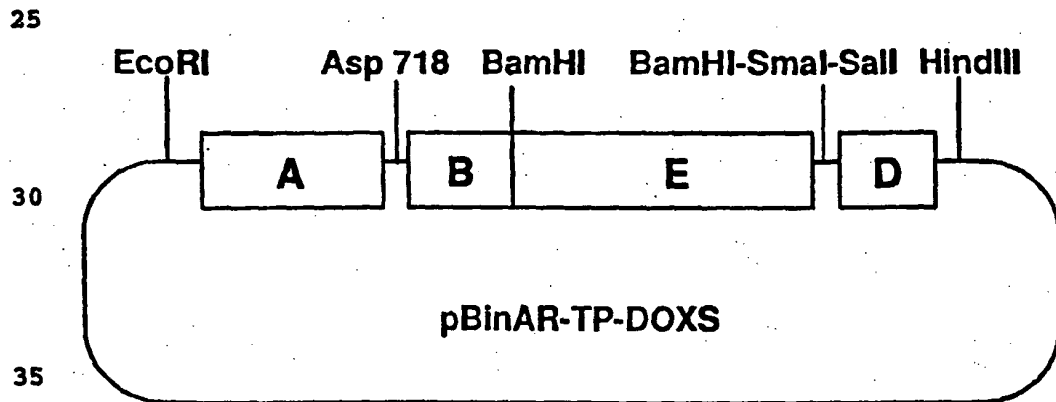


Abbildung 7: RNA Expressionslevel des DOXS-Gens

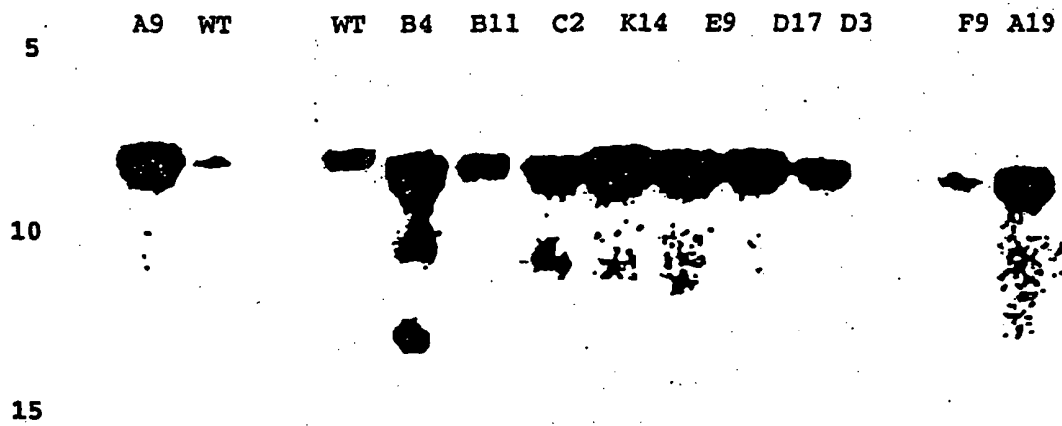


Abbildung 8: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

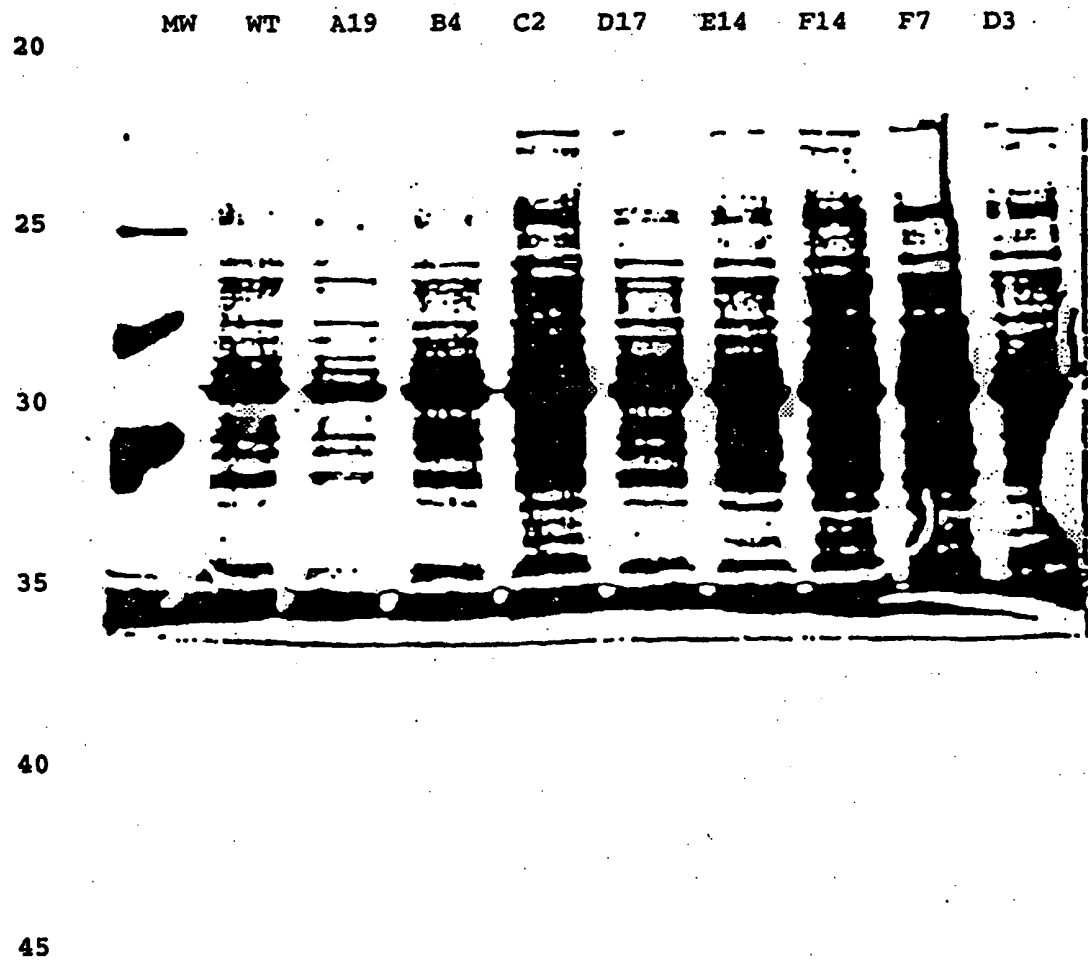


Abbildung 9: Westernanalyse

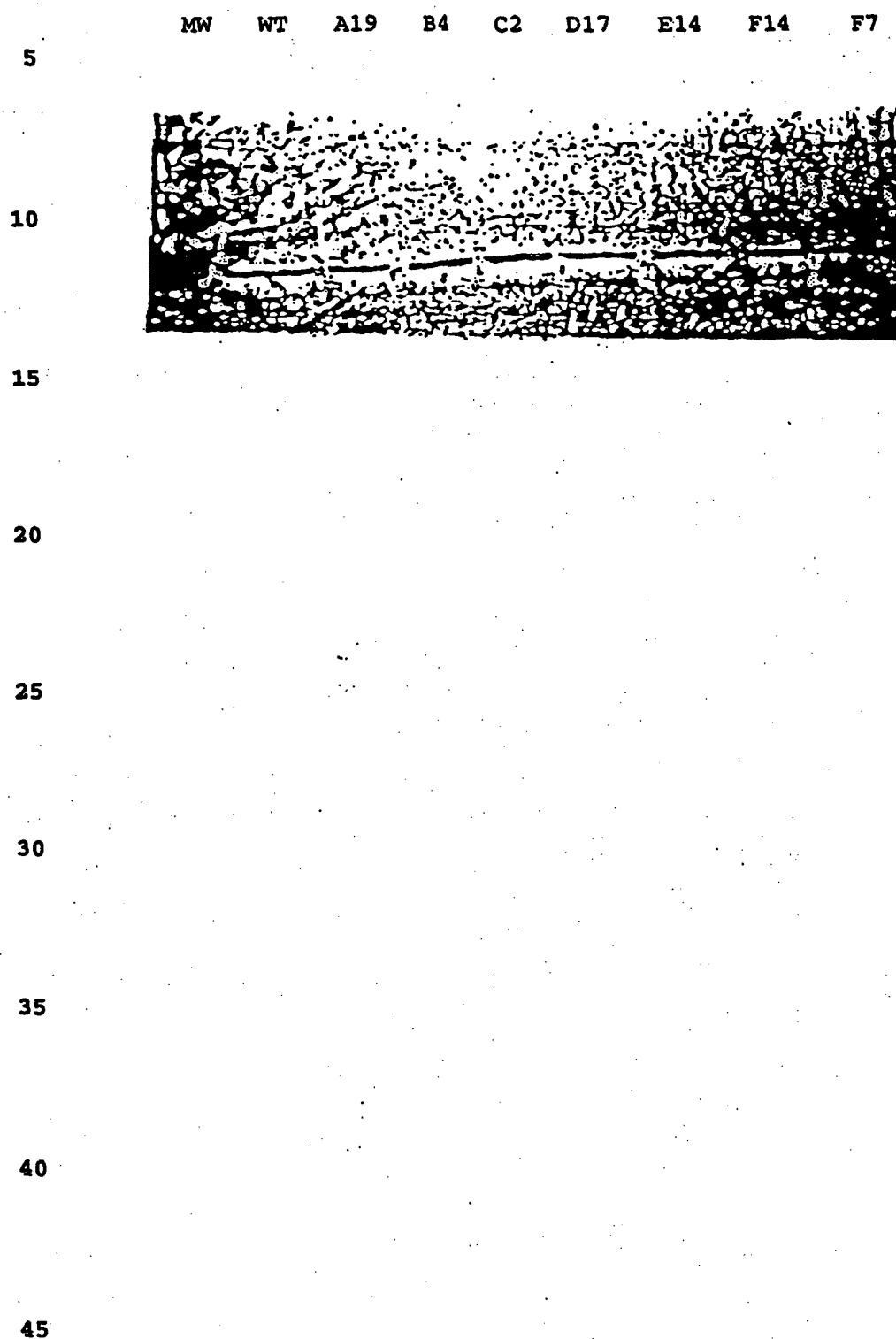


Abbildung 10

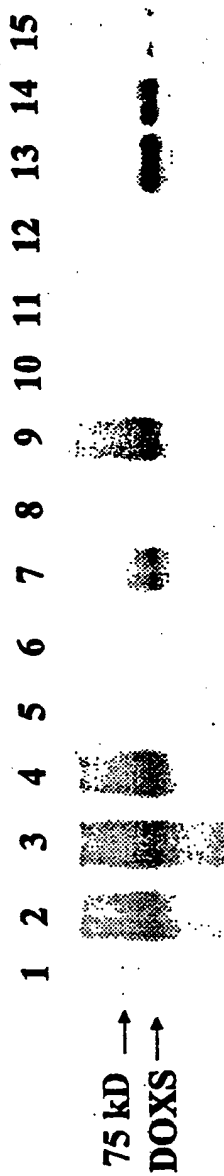
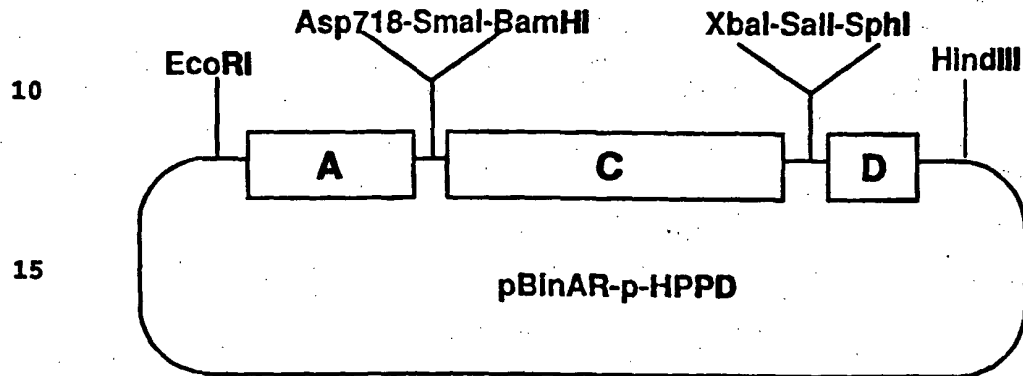


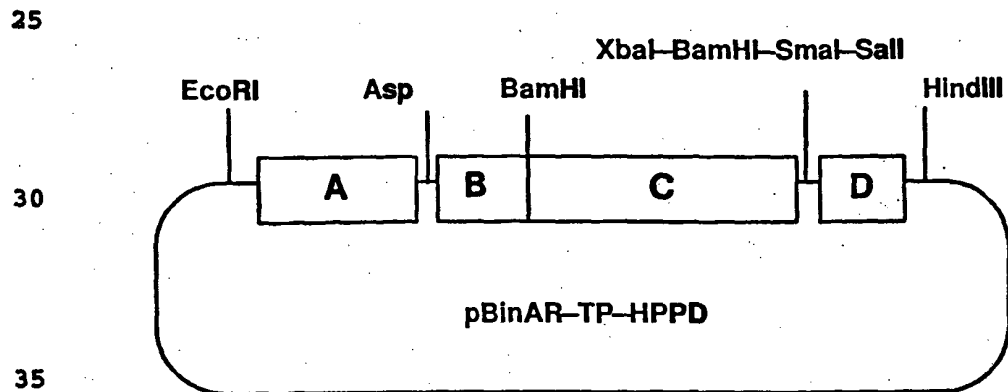
Abbildung 11

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Zytosol transgener Pflazen



20 Abbildung 12

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Plastiden transgener Pflanzen

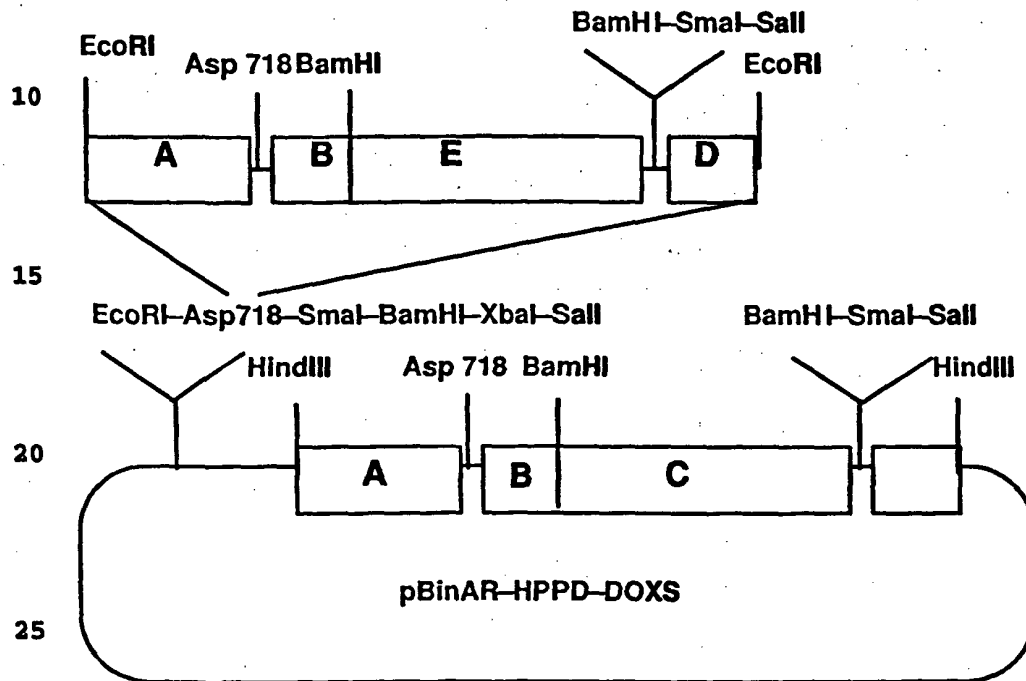


40

45

Abbildung 13

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* und des DOXS-Gens aus *E. coli* in Plastiden transgener Pflanzen.



30 Abbildung 14

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* in Plastiden transgener Pflanzen.

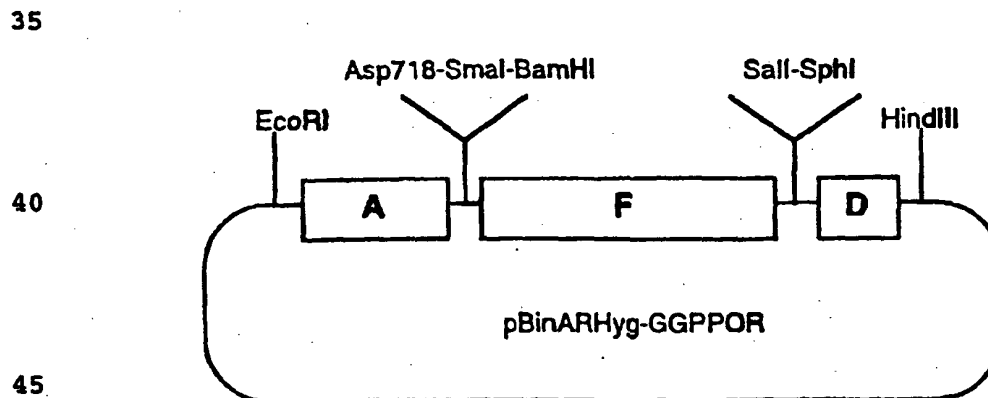


Abbildung 15

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des DOXS-Gens aus *E. coli* in Plastiden transgener Pflanzen.

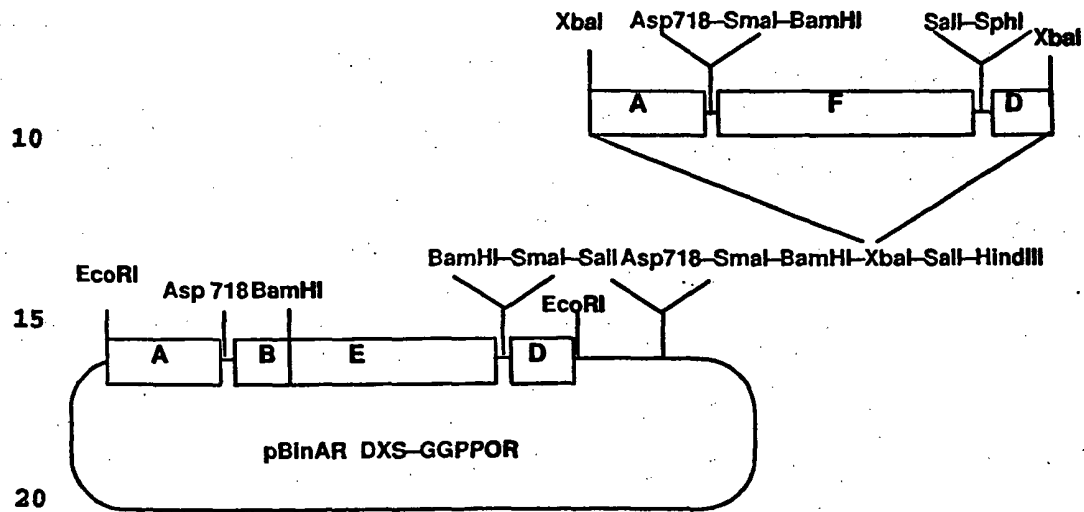
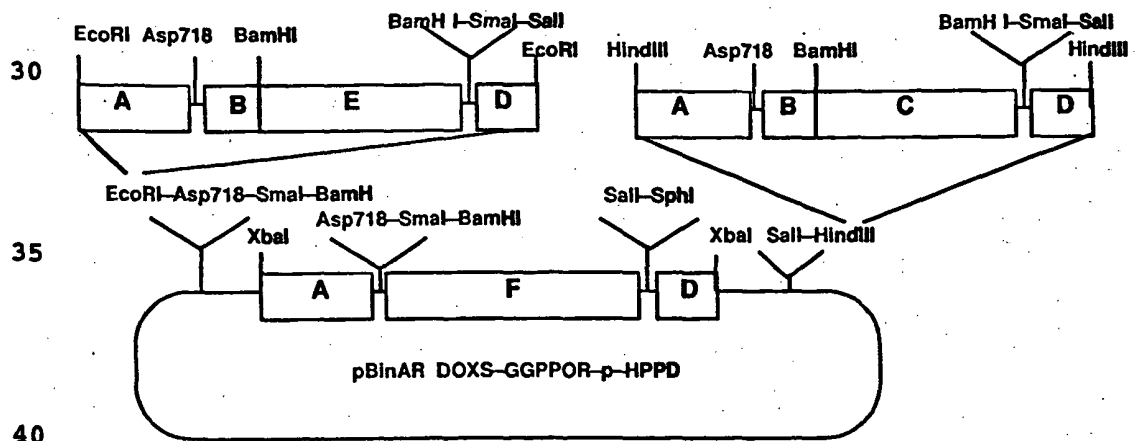


Abbildung 16

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.



■ 1

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KG&A

<120> DNA-Sequenz kodierend fuer eine
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

<130> 0050/49249

<140> 0817 - 00006

<141> 1999-08-04

<160> 8

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2458

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2154)

<400> 1

```

atg gct tct tct gca ttt gct ttt cct tct tac ata ata acc aaa gga      48
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly
   1             5             10             15

gga ctt tca act gat tct tgt aaa tca act tct ttg tct tct tct aga      96
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg
           20             25             30

tct ttg gtt aca gat ctt cca tca cca tgt ctg aaa ccc aac aac aat      144
Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn
        35             40             45

tcc cat tca aac aga aga gca aaa gtg tgt gct tca ctt gca gag aag      192
Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys
        50             55             60

ggt gaa tat tat tca aac aga cca cca act cca tta ctt gac act att      240
Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile
        65             70             75             80

aac tac cca atc cac atg aaa aat ctt tct gtc aag gaa ctg aaa caa      288
Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln

```

85	90	95	
ctt tct gat gag ctg aga tca gac gtg atc ttt aat gtg tcg aaa acc			336
Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr			
100	105	110	
ggt gga cat ttg ggg tca agt ctt ggt gtt gtg gag ctt act gtg gct			384
Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala			
115	120	125	
ctt cat tac att ttc aat act cca caa gac aag att ctt tgg gat gtt			432
Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val			
130	135	140	
ggt cat cag tct tat cct cat aag att ctt act ggg aga aga gga aag			480
Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys			
145	150	155	160
atg cct aca atg agg caa acc aat ggt ctc tct ggt ttc acc aaa cga			528
Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg			
165	170	175	
gga gag agt gaa cat gat tgc ttt ggt act gga cac agc tca acc aca			576
Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr			
180	185	190	
ata tct gct ggt tta gga atg gcg gta gga agg gat ttg aag ggg aag			624
Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys			
195	200	205	
aac aac aat gtg gtt gct gtg att ggt gat ggt gcg atg acg gca gga			672
Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly			
210	215	220	
cag gct tat gaa gcc atg aac aac gcc gga tat cta gac tct gat atg			720
Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met			
225	230	235	240
att gtg att ctt aat gac aac aag caa gtc tca tta cct aca gct act			768
Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr			
245	250	255	
ttg gat gga cca agt cca cct gtt ggt gca ttg agc agt gct ctt agt			816
Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser			
260	265	270	
cgg tta cag tct aac ccg gct ctc aga gag ttg aga gaa gtc gca aag			864
Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys			

275	280	285	
ggt atg aca aag caa ata ggc gga cca atg cat cag ttg gcg gct aag			912
Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys			
290	295	300	
gta gat gtg tat gct cga gga atg ata agc ggt act gga tcg tca ctg			960
Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu			
305	310	315	320
ttt gaa gaa ctc ggt ctt tac tat att ggt cca gtt gat ggg cac aac			1008
Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn			
325	330	335	
ata gat gat ttg gta gcc att ctt aaa gaa gtt aag agt acc aga acc			1056
Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr			
340	345	350	
aca gga cct gta ctt att cat gtg gtg acg gag aaa ggt cgt ggt tat			1104
Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr			
355	360	365	
cct tac gcg gag aga gct gat gac aaa tac cat ggt gtt gtg aaa ttt			1152
Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe			
370	375	380	
gat cca gca acg ggt aga cag ttc aaa act act aat gag act caa tct			1200
Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser			
385	390	395	400
tac aca act tac ttt gcg gag gca tta gtc gca gaa gca gag gta gac			1248
Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp			
405	410	415	
aaa gat gtg gtt gcg att cat gca gcc atg gga ggt gga acc ggg tta			1296
Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu			
420	425	430	
aat ctc ttt caa cgt cgc ttc cca aca aga tgt ttc gat gta gga ata			1344
Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile			
435	440	445	
gcg gaa caa cac gca gtt act ttt gct gcg ggt tta gcc tgt gaa ggc			1392
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly			
450	455	460	
ctt aaa ccc ttc tgt gca atc tat tcg tct ttc atg cag cgt gct tat			1440
Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr			

465	470	475	480	
gac cag gtt gtc cat gat gtt gat ttg caa aaa tta ccg gtg aga ttt				1488
Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe				
	485	490	495	
gca atg gat aga gct gga ctc gtt gga gct gat ggt ccg aca cat tgt				1536
Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys				
	500	505	510	
gga gct ttc gat gtg aca ttt atg gct tgt ctt cct aac atg ata gtg				1584
Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val				
	515	520	525	
atg gct cca tca gat gaa gca gat ctc ttt aac atg gtt gca act gct				1632
Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala				
	530	535	540	
gtt gcg att gat gat cgt cct tct tgt ttc cgt tac cct aga ggt aac				1680
Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn				
	545	550	555	560
ggt att gga gtt gca tta cct ccc gga aac aaa ggt gtt cca att gag				1728
Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu				
	565	570	575	
att ggg aaa ggt aga att tta aag gaa gga gag aga gtt gcg ttg ttg				1776
Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu				
	580	585	590	
ggt tat ggc tca gca gtt cag agc tgt tta gga gcg gct gta atg ctc				1824
Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu				
	595	600	605	
gaa gaa cgc gga tta aac gta act gta gcg gat gca cgg ttt tgc aag				1872
Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys				
	610	615	620	
cca ttg gac cgt gct ctc att cgc agc tta gct aag tcg cac gag gtt				1920
Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val				
	625	630	635	640
ctg atc acg gtt gaa gaa ggt tcc att gga ggt ttt ggc tcg cac gtt				1968
Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val				
	645	650	655	
gtt cag ttt ctt gct ctc gat ggt ctt ctt gat ggc aaa ctc aag tgg				2016
Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp				

660	665	670	
aga cca atg gta ctg cct gat cga tac att gat cac ggt gca cca gct			2064
Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala			
675	680	685	
gat caa cta gct gaa gct gga ctc atg cca tct cac atc gca gca acc			2112
Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr			
690	695	700	
gca ctt aac tta atc ggt gca cca agg gaa gct ctg ttt tga			2154
Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe			
705	710	715	
gagtaagaat ctgttggtta aaacatatgt atacaaacac tctaaatgca acccaagggt			2214
tcttctaagt actgatcaga attcccgccc gagaagtcct ttggcaacag ctatatatat			2274
ttactaagat tgtgaagaga aaggcaaagg caaagggttg gcaaagatta gtattataga			2334
taaaactggt atttgttttg taattttagg attgtgatga gatcgtgttg taccaataac			2394
taacatcttg taaaatcaat tactctcttg tgatcttcaa taagcttgag tgacaaaaaa			2454
aaaa			2458

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly

1

5

10

15

Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg

20

25

30

Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn

35

40

45

Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys

50

55

60

Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile

65

70

75

80

Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln
 85 90 95

Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr
 100 105 110

Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala
 115 120 125

Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val
 130 135 140

Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys
 145 150 155 160

Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg
 165 170 175

Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr
 180 185 190

Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys
 195 200 205

Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly
 210 215 220

Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met
 225 230 235 240

Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr
 245 250 255

Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser
 260 265 270

Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys
 275 280 285

Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys
 290 295 300

Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn
 325 330 335

Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr
 340 345 350

Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr
 355 360 365

Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe
 370 375 380

Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser
 385 390 395 400

Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp
 405 410 415

Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu
 420 425 430

Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
 435 440 445

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
 450 455 460

Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr
 465 470 475 480

Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
 485 490 495

Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
 500 505 510

Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
 515 520 525

Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
 530 535 540

Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 545 550 555 560

Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
 565 570 575

Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
 580 585 590

Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
 595 600 605

Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
 610 615 620

Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
 625 630 635 640

Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
 645 650 655

Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
 660 665 670

Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
 675 680 685

Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
 690 695 700

Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
 705 710 715

<210> 3

<211> 1863

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1863)

<400> 3

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48
 Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1 5 10 15

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96
 Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg 144
 Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

His	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	His	
50						55						60				
tat	gtc	tac	aac	acc	ccg	ttt	gac	caa	ttg	att	tgg	gat	gtg	ggg	cat	240
Tyr	Val	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Trp	Asp	Val	Gly	His	
65					70					75					80	
cag	gct	tat	ccg	cat	aaa	att	ttg	acc	gga	cgc	cgc	gac	aaa	atc	ggc	288
Gln	Ala	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Ile	Gly	
				85					90					95		
acc	atc	cgt	cag	aaa	ggc	ggt	ctg	cac	ccg	ttc	ccg	tgg	cgc	ggc	gaa	336
Thr	Ile	Arg	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Pro	Trp	Arg	Gly	Glu	
			100					105					110			
agc	gaa	tat	gac	gta	tta	agc	gtc	ggg	cat	tca	tca	acc	tcc	atc	agt	384
Ser	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	
			115					120					125			
gcc	gga	att	ggt	att	gcg	gtt	gct	gcc	gaa	aaa	gaa	ggc	aaa	aat	cgc	432
Ala	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Asn	Arg	
			130				135					140				
cgc	acc	gtc	tgt	gtc	att	ggc	gat	ggc	gcg	att	acc	gca	ggc	atg	gcg	480
Arg	Thr	Val	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Ala	
145					150					155					160	
ttt	gaa	gcg	atg	aat	cac	gcg	ggc	gat	atc	cgt	cct	gat	atg	ctg	gtg	528
Phe	Glu	Ala	Met	Asn	His	Ala	Gly	Asp	Ile	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Val	
				165					170					175		
att	ctc	aac	gac	aat	gaa	atg	tcg	att	tcc	gaa	aat	gtc	ggc	gcg	ctc	576
Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Met	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ala	Leu	
				180					185					190		
aac	aac	cat	ctg	gca	cag	ctg	ctt	tcc	ggt	aag	ctt	tac	tct	tca	ctg	624
Asn	Asn	His	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Leu	
			195					200					205			
cgc	gaa	ggc	ggg	aaa	aaa	gtt	ttc	tct	ggc	gtg	ccg	cca	att	aaa	gag	672
Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Glu	
			210				215				220					
ctg	ctc	aaa	cgc	acc	gaa	gaa	cat	att	aaa	ggc	atg	gta	gtg	cct	ggc	720
Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Glu	Glu	His	Ile	Lys	Gly	Met	Val	Val	Pro	Gly	
225					230					235				240		
acg	ttg	ttt	gaa	gag	ctg	ggc	ttt	aac	tac	atc	ggc	ccg	gtg	gac	ggt	768

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pr Val Asp Gly	
245 250 255	
cac gat gtg ctg ggg ctt atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg	816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu	
260 265 270	
aaa ggc ccg cag ttc ctg cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat	864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr	
275 280 285	
gaa ccg gca gaa aaa gac ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt	912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe	
290 295 300	
gat ccc tcc agc ggt tgt ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc	960
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser	
305 310 315 320	
tat tca aaa atc ttt ggc gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac	1008
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp	
325 330 335	
aac aag ctg atg gcg att act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg	1056
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met	
340 345 350	
gtc gag ttt tca cgt aaa ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att	1104
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile	
355 360 365	
gcc gag caa cac gcg gtg acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg	1152
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly	
370 375 380	
tac aaa ccc att gtc gcg att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat	1200
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr	
385 390 395 400	
gat cag gtg ctg cat gac gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc	1248
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe	
405 410 415	
gcc atc gac cgc gcg ggc att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag	1296
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln	
420 425 430	
ggg gct ttt gat ctc tct tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att	1344

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile	
435 440 445	
atg acc ccg agc gat gaa aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc	1392
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly	
450 455 460	
tat cac tat aac gat ggc ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac	1440
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn	
465 470 475 480	
gcg gtc ggc gtg gaa ctg acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa	1488
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys	
485 490 495	
ggc att gtg aag cgt cgt ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt	1536
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly	
500 505 510	
acg ctg atg cca gaa gcg gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg	1584
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr	
515 520 525	
ctg gtc gat atg cgt ttt gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg	1632
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu	
530 535 540	
gaa atg gcc gcc agc cat gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc	1680
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala	
545 550 555 560	
att atg ggc ggc gca ggc agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat	1728
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His	
565 570 575	
cgt aaa cca gta ccc gtg ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att	1776
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile	
580 585 590	
ccg caa gga act cag gaa gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc	1824
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala	
595 600 605	
gct ggt atg gaa gcc aaa atc aag gcc tgg ctg gca taa	1863
Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala	
610 615 620	

<210> 4

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1 5 10 15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
 50 55 60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
 65 70 75 80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
 85 90 95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
 100 105 110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
 115 120 125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
 130 135 140

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
 145 150 155 160

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
 165 170 175

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
 180 185 190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
 195 200 205

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
 210 215 220

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pr Gly
225 230 235 240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
260 265 270

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
275 280 285

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
290 295 300

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305 310 315 320

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
325 330 335

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
340 345 350

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
355 360 365

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
370 375 380

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465 470 475 480

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pr Ile Gly Lys
485 490 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
610 615 620

<210> 5

<211> 1469

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(1138)

<400> 5

gatatccgag cgccgccggg tccactgcgg tccgaagccg cggatgactc cattcgactg 60

aagccgggtcg agccgcgcct gcacgggtgcc gcgcgcgacc ccgagccgcc gggacatctc 120

gagcactccg atgcgcgggt cccgcgccag cagcaccagg agccggccgt ccagatgata 180

gatgccacg gcagcccctc cagtggatcat cctgtac atg cag ccc cac gcc atg 235

Met Gln Pro His Ala Met

1

5

ggc ggt gca ctg aac aca ttg tcc agc gga caa gcc aac tat tgc gca 283
 Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala
 10 15 20

cct tgc gga acg gag cga ccc tgc cgc cat gac gca gac cac aca cca 331
 Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro
 25 30 35

cac tcc cga cac cgc ccg gca ggc cga ccc ctt ccc ggt gaa ggg aat 379
 His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn
 40 45 50

gga cgc ggt cgt ctt cgc cgt agg caa cgc caa gca ggc cgc gca cta 427
 Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Gln Arg Ala Gly Arg Ala Leu
 55 60 65 70

ctc cac cgc ctt cgg cat gca gct tgt ggc gta ctc cgg acc gga gaa 475
 Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly Val Leu Arg Thr Gly Glu
 75 80 85

cgg cag ccg cga gac cgc ttc gta cgt cct cac caa cgg ctc ggc acg 523
 Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro His Gln Arg Leu Gly Thr
 90 95 100

ctt cgt cct cac ctc cgt cat caa gcc cgc cac ccc ctg ggg cca ctt 571
 Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg His Pro Leu Gly Pro Leu
 105 110 115

cct cgc cga cca tgt ggc cga gca cgg cga cgg cgt cgt cga cct cgc 619
 Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg
 120 125 130

cat cga ggt ccc gga cgc ccg cgc cgc cca cgc gta cgc gat cga gca 667
 His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro Arg Val Arg Asp Arg Ala
 135 140 145 150

cgg cgc ccg ctc ggt cgc cga gcc gta cga gct gaa gga cga gca cgg 715
 Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg Ala Glu Gly Arg Ala Arg
 155 160 165

cac ggt cgt cct cgc cgc gat cgc cac cta cgg caa gac ccg cca cac 763
 His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu Arg Gln Asp Pro Pro His
 170 175 180

cct cgt cga ccg gac cgg cta cga cgg ccc cta cct ccc cgg cta cgt 811
 Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro Leu Pro Pro Arg Leu Arg
 185 190 195

ggc cgc cgc ccc gat cgt cga acc gcc cgc cca ccg cac ctt cca ggc 859
 Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg Pro Pr His Leu Pr Gly
 200 205 210

cat cga cca ctg cgt cgg caa cgt cga gct cgg ccg gat gaa cga atg 907
 His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Arg Met
 215 220 225 230

ggt cgg ctt cta caa caa ggt cat ggg ctt cac gaa cat gaa gga gtt 955
 Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu His Glu His Glu Gly Val
 235 240 245

cgt ggg cga cga cat cgc gac cga gta ctc ggc gct gat gtc gaa ggt 1003
 Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu Gly Ala Asp Val Glu Gly
 250 255 260

cgt ggc cga cgg cac gct caa ggt caa gtt ccc gat caa cga gcc cgc 1051
 Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val Pro Asp Gln Arg Ala Arg
 265 270 275

cct cgc caa gaa gaa gtc cca gat cga cga gta cct gga gtt cta cgg 1099
 Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg Val Pro Gly Val Leu Arg
 280 285 290

cgg cgc ggg cgt cca gca cat cgc gct gaa cac ggg tga catcgtcgag 1148
 Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu His Gly
 295 300 305

acggtacgca cgatgcgcgc cgccggcgctc cagttcctgg acacgcccga ctcgtactac 1208
 gacaccctcg gggagtgggt gggcgacacc cgcgtccccg tcgacaccct gcgcgagctg 1268
 aagatcctcg cggaccgca cgaggacggc tatctgctcc agatcttcac caagccggtc 1328
 caggaccgcc cgacggtctt ctteagatc atcgaacgcc acggctcgat gggattcggc 1388
 aagggcaact tcaaggccct gtteagggcg atcgagcggg agcaggagaa gcggggcaac 1448
 ctgtaggcgg cgcgcccg g 1469

<210> 6

<211> 306

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6

Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly

1	5	10	15
Gln Ala Asn Tyr Cys Ala Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His	20	25	30
Asp Ala Asp His Thr Pro His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro	35	40	45
Leu Pro Gly Glu Gly Asn Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg	50	55	60
Gln Ala Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly	65	70	75
Val Leu Arg Thr Gly Glu Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro	85	90	95
His Gln Arg Leu Gly Thr Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg	100	105	110
His Pro Leu Gly Pro Leu Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg	115	120	125
Arg Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro	130	135	140
Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg	145	150	155
Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu	165	170	175
Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro	180	185	190
Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg	195	200	205
Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala	210	215	220
Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu	225	230	235
His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu	245	250	255
Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val			

260 265 270

Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg
 275 280 285

Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu
 290 295 300

His Gly
 305

<210> 7
 <211> 1479
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1401)

<400> 7

atg gcg acg acg gtt aca ctc aaa tcc ttc acc gga ctt cgt caa tca	48
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser	
1 5 10 15	
tca acg gag caa aca aac ttc gtc tct cat gta ccg tca tca ctt tct	96
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser	
20 25 30	
ctc cct caa cga cgg acc tct ctc cga gta acc gca gcc agg gcc act	144
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr	
35 40 45	
ccc aaa ctc tcc aac cgt aaa ctc cgt gtc gcc gtc atc ggt ggt gga	192
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly	
50 55 60	
cca gca ggc ggg gca gct gca gag act cta gca caa gga gga atc gag	240
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu	
65 70 75 80	
acg att ctc atc gag cgt aag atg gac aat tgc aag cct tgc ggt ggc	288
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly	
85 90 95	
gcg att cct ctc tgt atg gtc gga gaa ttc aac ttg ccg ttg gat att	336
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Il	

100	105	110	
att gat cgg aga gtg acg aag atg aag atg att tcg ccg tcg aac att			384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile			
115	120	125	
gct gtt gat att ggt cgt acg ctt aag gag cat gag tat ata ggt atg			432
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met			
130	135	140	
gtg aga aga gaa gtt ctt gat gct tat ctg aga gag aga gct gag aag			480
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys			
145	150	155	160
agt gga gcc act gtg att aac ggt ctc ttc ctt aag atg gat cat ccg			528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro			
165	170	175	
gag aat tgg gac tcg ccg tac act ttg cat tac act gag tac gat ggt			576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly			
180	185	190	
aaa act gga gct aca ggg acg aag aaa aca atg gag gtt gat gct gtc			624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val			
195	200	205	
att gga gct gat gga gct aac tct agg gtt gct aaa tct att gat gct			672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala			
210	215	220	
ggg gat tac gac tac gca att gca ttt cag gag agg att agg att cct			720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro			
225	230	235	240
gat gag aaa atg act tac tat gag gat tta gct gag atg tat gtt gga			768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly			
245	250	255	
gat gat gtg tcg ccg gat ttc tat ggt tgg gtg ttc cct aag tgc gac			816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp			
260	265	270	
cat gta gct gtt gga aca ggt act gtg act cac aaa ggt gac atc aag			864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys			
275	280	285	
aag ttc cag ctc gcg acc aga aac aga gct aag gac aag att ctt gga			912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly			

290	295	300	
ggg aag atc atc cgt gtg gag gct cat ccg att cct gaa cat ccg aga			960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pr Arg			
305	310	315	320
cca cgt agg ctc tcg aaa cgt gtg gct ctt gta ggt gat gct gca ggg			1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly			
325	330		335
tat gtg act aaa tgc tct ggt gaa ggg atc tac ttt gct gct aag agt			1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser			
340	345		350
gga aga atg tgt gct gaa gcc att gtc gaa ggt tca cag aat ggt aag			1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys			
355	360		365
aag atg att gac gaa ggg gac ttg agg aag tac ttg gag aaa tgg gat			1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp			
370	375		380
aag aca tac ttg cct acc tac agg gta ctt gat gtg ttg cag aaa gtg			1200
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val			
385	390		395
400			
ttt tac aga tca aat ccg gct aga gaa gcg ttt gtg gag atg tgt aat			1248
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn			
405	410		415
gat gag tat gtt cag aag atg aca ttc gat agc tat ctg tac aag cgg			1296
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg			
420	425		430
gtt gcg ccg ggt agt cct ttg gag gat atc aag ttg gct gtg aac acc			1344
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr			
435	440		445
att gga agt ttg gtt agg gct aat gct cta agg aga gag att gag aag			1392
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys			
450	455		460
ctt agt gtt taagaacaaa ataatgaggt ctatctcctt tcttcatctc			1441
Leu Ser Val			
465			
tatctctctt tttttgtctg ttagtaatatct atctacac			1479

<210> 8

<211> 467

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
 35 40 45

Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
 50 55 60

Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
 85 90 95

Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile
 100 105 110

Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile
 115 120 125

Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met
 130 135 140

Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro
 165 170 175

Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
 180 185 190

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
 195 200 205

Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala
 210 215 220

Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pr
 225 230 235 240
 Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
 245 250 255
 Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
 260 265 270
 His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
 275 280 285
 Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
 290 295 300
 Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
 305 310 315 320
 Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
 325 330 335
 Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
 340 345 350
 Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
 355 360 365
 Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
 370 375 380
 Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
 385 390 395 400
 Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
 405 410 415
 Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
 420 425 430
 Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
 435 440 445
 Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
 450 455 460
 Leu Ser Val
 465

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/05467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N9/04
C12Q1/02 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGE B M ET AL: "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2100-4. , XP002116672 cited in the application	1,2,9, 13,17,18
Y	see particularly the last paragraph	20,21
X	MANDEL A. ET AL.: "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution" PLANT JOURNAL, vol. 9, no. 5, 1996, pages 649-658, XP002122907 the whole document	22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

03/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponi,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24 July 1996 (1996-07-24) page 3, line 35-54	20,21
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 (1997-07-31) cited in the application the whole document	1-22
A	WO 98 06862 A (SHEWMAKER CHRISTINE K ;CALGENE INC (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) the whole document	1-22
A	LOIS L M ET AL: "Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2105-10. , XP002116673 the whole document	1-22
A	SPRENGER G A ET AL: "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 NOV 25) 94 (24) 12857-62. , XP002116674 cited in the application the whole document	1-22
A	KELLER ET AL: "metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis - evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,DE,BERLIN, vol. 251, no. 1/02, page 413-417-417 XP002100518 ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document	1-22
P,X	WO 99 11757 A (MCCASKILL DAVID G ;LANGE BERND M (US); UNIV WASHINGTON (US); WILDU) 11 March 1999 (1999-03-11) see particularly Page 14 line 29 to Page 15 line 21.	1,2,9, 13,17-22
	-/-	

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/05467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DE 197 52 700 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 2 June 1999 (1999-06-02) see particularly Page 6 line 20 and following; Example 6	20,21
E	WO 99 52938 A (HASSAN JOMAA) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	18-22

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05467

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0723017	A	24-07-1996	DE 19501906	A	25-07-1996
			CA 2167768	A	24-07-1996
			US 5912169	A	15-06-1999
			US 5925535	A	20-07-1999
WO 9727285	A	31-07-1997	AU 1845397	A	20-08-1997
			EP 0877793	A	18-11-1998
			JP 11510708	T	21-09-1999
WO 9806862	A	19-02-1998	AU 4058497	A	06-03-1998
			CN 1227609	A	01-09-1999
			EP 0925366	A	30-06-1999
WO 9911757	A	11-03-1999	AU 8925898	A	22-03-1999
DE 19752700	A	02-06-1999	DE 29800547	U	08-04-1999
			JP 11169186	A	29-06-1999
WO 9952938	A	21-10-1999	DE 19825585	A	21-10-1999
			WO 9952515	A	21-10-1999

NERAC, Inc.
One Technology Dr.
Tolland, CT 06084
(860) 872-7000

Renl - 00-084
01/24335

DOCUMENT SERVICE

Order No. 0293512-001

This copy is being furnished for private research use only. It may not be further reproduced, resold, or used for publication. The customer assumes full responsibility for copyright questions that may arise concerning this reproduction or the use of the material. NERAC assumes no liability for contents of this material, nor use thereof.

TO: Ms. Darlene Rentschler
Renessen, LLC
Suite 300
3000 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015

APR 15 2003
LEGAL DEPT.

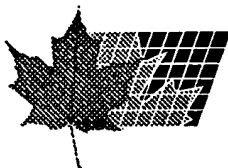
0293512-001

SAVE THIS PACKING SLIP TO COMPARE WITH INVOICE AND WITH STATEMENT

CUST.ORDER DATE: 04/10/03 NERAC QUESTION:
ORDER RECEIVED: 04/10/03
DOCUMENT MAILED: 04/10/03 P.O. NO. 00-084 TOCO

TITLE: Canadian Patent # CA 2339519

LANGUAGE: English only

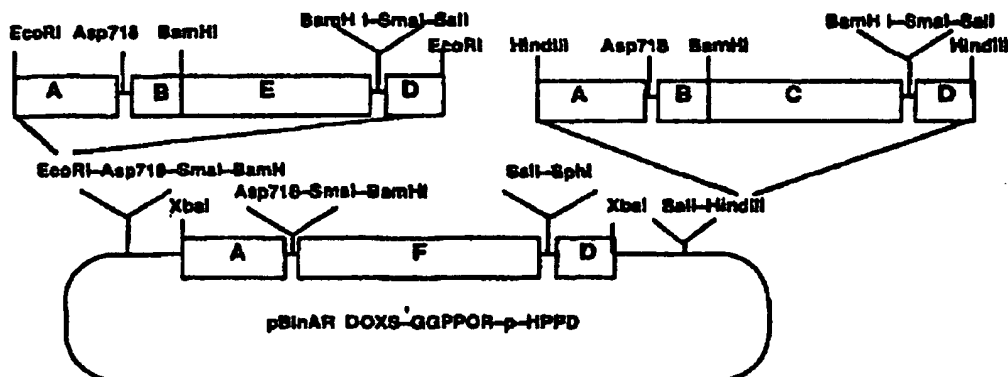


(86) 1999/07/30

(87) 2000/02/17

- (72) REINDL, ANDREAS, DE
(72) LEON MEJIA, PATRICIA, MX
(72) ESTEVES PALMAS, JUAN MANUEL, MX
(72) CANTERO GRACIA, MARIA ARACELI, MX
(72) EBNETH, MARCUS, DE
(72) HERBERS, KARIN, DE
(71) SUNGENE GMBH & CO.KGAA, DE
(51) Int.Cl.⁷ C12N 15/53, C12N 15/82, C12N 15/54, C12N 9/10,
C12N 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00
(30) 1998/08/05 (198 35 219.0) DE
(30) 1998/10/01 (198 45 216.0) DE
(30) 1998/10/01 (198 45 224.1) DE
(30) 1998/10/01 (198 45 231.4) DE
(54) SEQUENCE ADN CODANT POUR UNE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE ET SA SURPRODUCTION DANS LES PLANTES
(54) DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS

BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSION THE DOXS-GENE FROM E. COLI, THE GGPPOR GENE FROM ARABIDOPSIS THALIANA AND THE HPPD GENE FROM STREPTOMYCES AVERMITILIS IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS



- (57) Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from Arabidopsis or E. coli.



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/53, 15/54, 15/82, 9/10, 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08169 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)												
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05467 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99) (30) Prioritätsdaten: <table border="0"> <tr> <td>198 35 219.0</td> <td>5. August 1998 (05.08.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>198 45 216.0</td> <td>1. Oktober 1998 (01.10.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>198 45 231.4</td> <td>1. Oktober 1998 (01.10.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>198 45 224.1</td> <td>1. Oktober 1998 (01.10.98)</td> <td>DE</td> </tr> </table>		198 35 219.0	5. August 1998 (05.08.98)	DE	198 45 216.0	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE	198 45 231.4	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE	198 45 224.1	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE	(74) Anwalt: LANGFINGER, Klaus-Dieter; BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
198 35 219.0	5. August 1998 (05.08.98)	DE													
198 45 216.0	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE													
198 45 231.4	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE													
198 45 224.1	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE													
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SUN-GENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06468 Gatersleben (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). MEJIA, Patricia Leon [MX/MX]; Ganizalo de Sandoval 226, Cuernavaca, Morelos 62250 (MX). PALMAS, Juan Manuel Esteves [MX/MX]; Entrada a Ojo de Agua Col., Loma Bonita Tecamac Estado (MX). GRACIA, Maria Araceli Canter [MX/MX]; 2da Privad Los Pinos 22, Loma Bonita Cuernavaca, Morelos 62210 (MX). EBNETH, Marcus [DE/DE]; Bicklingerweg 16, D-06486 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>													

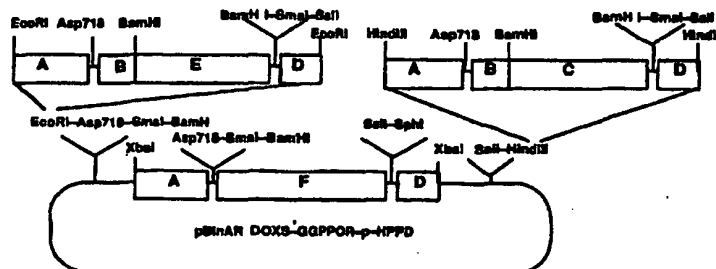
817/00006
030501

(54) Title: **DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS**

(54) Bezeichnung: **DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT SYNTHASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN**

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.

BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSING THE DOXS-GENE FROM *E. COLI*, THE GGPPOR GENE FROM *ARABIDOPSIS THALIANA* AND THE HPPD GENE FROM *STREPTOMYCES AVERMITILIS* IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS



(57) Abstract

Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from *Arabidopsis* or *E. coli*.

Mec

DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE
SYNTHASE AND THE OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS

The present invention relates to the use of DNA sequences coding for a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) for producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents, specifically to the use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 or of a DNA sequence hybridizing with the latter, to the use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and of a DNA sequence SEQ ID No. 5 or DNA sequences hybridizing with the latter and coding for a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and a p-dihydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) for producing plants with increased content of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and/or carotenoids, to the use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and of a DNA sequence SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter and coding for a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and a geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) for producing plants with increased content of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and/or carotenoids, to the use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, of a DNA sequence SEQ ID No. 5 and of a DNA sequence SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter and coding for a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS), a hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) and a geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) for producing plants with increased content of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and/or carotenoids, to processes for producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents, comprising a DNA sequence SEQ-ID No. 1 or SEQ ID No. 3; SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5; SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 7 or a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7, to the plants themselves produced in this way, and to the use of SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 for producing a test system for identifying DOXS inhibitors.

An important aim of molecular genetic work on plants to date has been the generation of plants with increased content of sugars, enzymes and amino acids. However, there is also commercial interest in the development of plants with increased content of vitamins, such as increasing the tocopherol content.

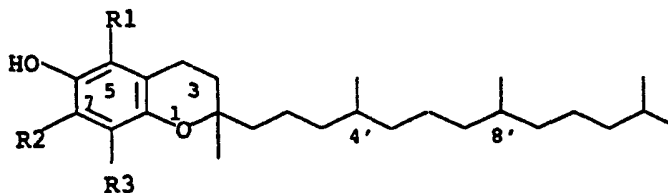
The eight compounds with vitamin E activity which occur in nature are derivatives of 6-chromanol (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft,

0817/00006

2

Chapter 4, 478-488, Vitamin E). The first group (1a-d) is derived from tocopherol, while the second group consists of derivatives of tocotrienol (2a- d):

5



10

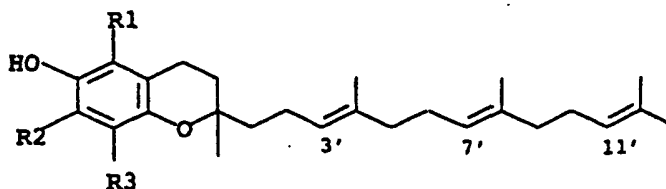
1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

15 1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

20



25

2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

30

The compound of great commercial importance is α -tocopherol.

There are limits on the development of crop plants with increased tocopherol content through tissue culture or seed mutagenesis and
 35 natural selection. Thus, on the one hand, the tocopherol content must be measurable even in the tissue culture and, on the other hand, the only plants which can be manipulated by tissue culture techniques are those which can be regenerated to whole plants from cell cultures. In addition, crop plants may, after
 40 mutagenesis and selection, show unwanted properties which must be eliminated again by backcrossings, several times in some instances. Moreover increasing the tocopherol content by crossing would be restricted to plants of the same species.

45 For these reasons, the genetic engineering procedure of isolating, and transferring into target crop plants, an essential biosynthesis gene coding for tocopherol synthesis activity is

0817/00006

3

superior to the classical breeding method. The preconditions for this process are that the biosynthesis and its regulation are known and that genes which influence the biosynthetic activity are identified.

5

Isoprenoids or terpenoids consist of various classes of lipid-soluble molecules and are formed partly or completely of C₅-isoprene units. Pure prenyl lipids (e.g. carotenoids) consist of C skeletons derived exclusively from isoprene units, whereas
10 mixed prenyl lipids (e.g. chlorophyll) have an isoprenoid side chain connected to an aromatic nucleus.

The biosynthesis of prenyl lipids starts from 3 x acetyl-CoA units, which are converted via β -hydroxymethylglutaryl-CoA
15 (HMG-CoA) and mevalonate into the initial isoprene unit (C₅), isopentenyl pyrophosphate (IPP). It has recently been shown by in vivo feeding experiments with C¹³ that a mevalonate-independent pathway is followed in various eubacteria, green algae and plant chloroplasts to produce IPP:

20

25

30

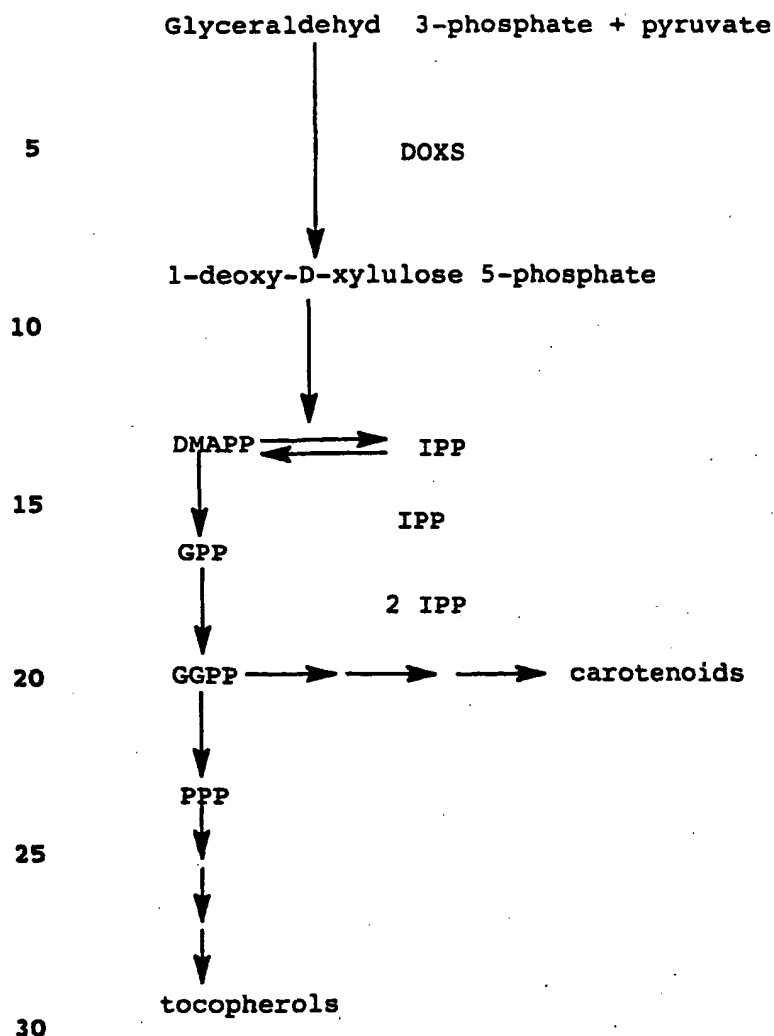
35

40

45

0817/00006

4



This entails hydroxyethylthiamine, which is produced by decarboxylation of pyruvate, and glyceraldehyde 3-phosphate (3-GAP) being converted, in a "transketolase" reaction mediated by 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, initially into 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1), 129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 271-274(1997). The latter is then converted by an intramolecular rearrangement into IPP (Arigoni et al., 1997). Biochemical data indicate that the mevalonate pathway operates in the cytosol and leads to the production of phytosterols. The antibiotic mevinolin, a specific inhibitor of mevalonate production, leads only to inhibition of sterol biosynthesis in the cytoplasm, whereas pr nyl lipid production in the plastids is unaffected (Bach and Lichtenthaler, Physiol. Plant 59(1983), 50-60. By

0817/00006

5

contrast, the mevalonate-independent pathway has a plastidic localization and leads mainly to the production of carotenoids and plastidic prenyl lipids (Schwender et al., 1997; Arigoni et al, 1997).

5

IPP is in equilibrium with its isomer, dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Condensation of IPP with DMAPP in a head-tail addition affords the monoterpene (C₁₀) geranyl pyrophosphate (GPP). Addition of further IPP units results in the sesquiterpene

- 10 (C₁₅) farnesyl pyrophosphate (FPP) and the diterpene (C₂₀) geranyl-geranyl pyrophosphate (GGPP). Linkage of two GGPP molecules results in the production of the C₄₀ precursors for carotenoids. GGPP is transformed by a prenyl chain hydrogenase into phytyl pyrophosphate (PPP), the starting material for
- 15 further production of tocopherols.

The ring structures of the mixed prenyl lipids which lead to the production of vitamins E and K comprise quinones whose initial metabolites are derived from the shikimate pathway. The aromatic

20 amino acids phenylalanine and tyrosine are converted into hydroxyphenylpyruvate, which is transformed by dioxygenation into homogentisic acid. The latter is bound to PPP in order to produce 2-methyl-6-phytylquinol, the precursor of α -tocopherol and α -tocoquinone. Methylation steps with S-adenosylmethionine as

25 methyl group donor result initially in 2,3-dimethyl-6-phytylquinol and then, by cyclization, in γ -tocopherol and, by methylation again, in α -tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

- 30 Examples are to be found in the literature showing that manipulation of an enzyme can influence the direction of the metabolite flux. It was possible in experiments with modified expression of phytoene synthase, which links two GGPP molecules together to give 15-cis-phytoene, to measure a direct effect on
- 35 the amounts of carotenoids in these transgenic tomato plants (Fray and Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995). As expected, transgenic tobacco plants with reduced amounts of phenylalanine-ammonium lyase show reduced phenylpropanoid amounts. The enzyme
- 40 phenylalanine-ammonium lyase catalyzes the breakdown of phenylalanine and thus removes it from phenylpropanoid biosynthesis (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996).

45

0817/00006

6

To date, little has been disclosed about increasing the metabolite flux in order to increase the tocopherol content of plants through overexpression of individual biosynthesis genes. There is merely a description in WO 97/27285 of modification of
5 the tocopherol content by increased expression or by down-regulation of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD).

It is an object of the present invention to develop a transgenic
10 plant with increased content of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and carotenoids.

We have found that this object is achieved by overexpression of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate sythase (DOXS) gene in the plants.
15

In order to increase the metabolite flux from primary metabolism into isoprenoid metabolism, the production of IPP as general starting substrate for all plastidic isoprenoids was increased. For this purpose, the DOXS activity in plants was increased by
20 overexpression of the homologous gene (gene from organism of the same species). This can also be achieved by expressing a heterologous gene (gene from remote organisms). Nucleotide sequences from Arabidopsis thaliana DOXS (Acc. No. U 27099), rice (Acc. No. AF024512) and peppermint (Acc. No. AF019383) are
25 described.

In one example 1 there is enhanced expression of the DOXS gene from Arabidopsis thaliana (SEQ ID No.:1; Mandel et al., Plant J. 9, 649-658(1996); Acc. No. U27099) in transgenic plants.
30 Plastidic localization is ensured by the transit signal sequence present in the gene sequence. A suitable expression cassette is also a DNA sequence which codes for a DOXS gene which hybridizes with SEQ ID No. 1 and which is derived from other organisms such as, for example, E. coli (SEQ ID No.3) or, preferably, from other
35 plants.

The GGPP which is now available in increased quantities is converted further in the direction of tocopherols and carotenoids.

40

Efficient production of carotenoids is essential for photosynthesis, where they serve together with chlorophylls as "light-collecting complexes" for better utilization of the energy of photons (Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer
45 Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 1996). In addition, carotenoids carry out important functions protecting from oxygen free radicals such as singlet oxygen, which they are able to return to

0817/00006

7

the ground state (Asada, 1994; Demming-Adams and Adams, Trends in Plant Sciences 1; 21-26(1996). A 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase-defective Arabidopsis thaliana mutant showing an "albino phenotype" has been isolated (Mandel et al., 1996). It can be
5 inferred from this that a reduced amount of carotenoids in the plastids has adverse effects on the plant.

We have found that the object is also achieved by overexpression of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) gene and of a
10 p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) gene in the plants, see Figure 1.

In order to increase the metabolite flux from primary metabolism into isoprenoid metabolism, the production of IPP as general
15 starting substrate for all plastidic isoprenoids was increased. For this purpose, the DOXS activity in transgenic tobacco and oilseed rape plants was increased by overexpression of the DOXS from E. coli. This can be achieved by expression of homologous or other heterologous genes.

20 The D-1-deoxy-xylulose 5-phosphate which is now available in increased quantities is converted further in the direction of tocopherols and carotenoids.

25 In addition, the production of homogentisic acid further intensifies the metabolite flux in the direction of phytylquinones and thus tocopherol, see Figure 1. Homogentisic acid is produced from p-hydroxyphenylpyruvate by the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD). cDNAs coding for this
30 enzyme have been described from various organisms such as, for example, from microorganisms, from plants and from humans.

In Example 11 there was for the first time overexpression of the HPPD gene from Streptomyces avermitilis (Denoya et al.,
35 J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ ID No. 5) together with the DOXS from E. coli SEQ ID No. 3 in plants and plant plastids.

The increase in the plastidic IPP production leads to enhanced production of all plastidic isoprenoids. The increased provision
40 of homogentisic acid ensures that sufficient substrate is available for the production of tocopherols in the plastids. This homogentisate which is now available in increased quantities can in turn be converted in the transgenic plants with the amount, which is increased due to the overexpression of DOXS, of phytyl
45 diphosphate (PPP). PPP occupies a key position, in this connection, because it serves on the one hand as starting

0817/00006

8

substrate for chlorophylls and phylloquinones, and on the other hand for tocopherols.

The transgenic plants are produced by transformation of the
5 plants with a construct containing the DOXS and HPPD genes. Tobacco and oilseed rape were employed as model plants for the production of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and carotenoids.

- 10 The invention also relates to the use of the DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5, which code for a DOXS or HPPD or functional equivalents thereof, for producing a plant with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents. The nucleic acid sequences may in these
15 cases be, for example, DNA or cDNA sequences. Coding sequences suitable for insertion into an expression cassette are, for example, those coding for a DOXS or HPPD and conferring on the host the ability to overproduce tocopherol.
- 20 The expression cassettes additionally comprise regulatory nucleic acid sequences which control the expression of the coding sequence in the host cell. In a preferred embodiment, an expression cassette comprises upstream, i.e. at the 5' end of the coding sequence, a promoter and downstream, i.e. at the 3' end, a
25 polyadenylation signal and, where appropriate, further regulatory elements which are operatively linked to the coding sequence for the DOXS or HPPD gene located in between.

- An expression cassette is produced by fusing a suitable promoter
30 to a suitable DOXS or HPPD DNA sequence and preferably a DNA which is inserted between promoter and DOXS or HPPD DNA sequence and codes for a chloroplast-specific transit peptide, and a polyadenylation signal by conventional recombination and cloning techniques as described, for example, in T. Maniatis, E.F.
35 Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), and in T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) and in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in
40 Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

- It is also possible to use expression cassettes whose DNA
sequence codes for a DOXS or HPPD fusion protein, where part of
45 the fusion protein is a transit peptide which controls translocation of the polypeptide. Transit peptides which are specific for chloroplasts and which are eliminated enzymatically

0817/00006

9

from the DOXS or HPPD part after translocation of the DOXS or HPPD gene into the chloroplasts are preferred. The particularly preferred transit peptide is derived from the plastidic transketolase (TK) or a functional equivalent of this transit peptide (for example the transit peptide of the small subunit of rubisco or ferredoxin-NADP oxidoreductase).

The fused expression cassette coding for a DOXS gene and an HPPD gene is preferably cloned into a vector, for example pBin19, which is suitable for transformation of *Agrobacterium tumefaciens*.

The invention further relates to the use of an expression cassette comprising DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ-ID No. 3 and SEQ ID No. 5 or DNA sequences hybridizing with the latter for the transformation of plants or cells, tissues or parts of plants. The preferred aim of the use is to increase the tocopherol, vitamin K, chlorophyll and carotenoid contents of the plant.

It is moreover possible, depending on the choice of the promoter, for expression to take place specifically in the leaves, in the seeds or other parts of the plant. The present invention further relates to such transgenic plants, propagation material thereof and cells, tissues or parts of these plants.

The invention additionally relates to transgenic plants transformed with an expression cassette comprising the sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5 or DNA sequences hybridizing with the latter, and transgenic cells, tissues, parts and propagation material of such plants. Particular preference is given in this connection to transgenic crop plants such as, for example, barley, wheat, rye, corn, oats, soybean, rice, cotton, sugarbeet, canola, sunflower, flax, hemp, potato, tobacco, tomato, oilseed rape, alfalfa, lettuce and the various tree, nut and vine species.

The invention further relates to:

40 - Process for transforming a plant, which comprises introducing expression cassettes comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and a DNA sequence SEQ ID No. 5 or DNA sequences hybridizing with the latter into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plants,

45

0817/00006

10

- Use of the DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5 or DNA sequences hybridizing with the latter to produce plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents by expression of a
- 5 DOXS and an HPPD DNA sequence in plants.

The object have also been achieved by overexpression of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) gene and of a geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) gene in the

10 plants, see Figure 1.

- In order to increase the metabolite flux from primary metabolism into isoprenoid metabolism, the production of IPP as general starting substrate for all plastidic isoprenoids was increased.
- 15 For this purpose, the DOXS activity in transgenic tobacco and oilseed rape plants was increased by overexpression of the DOXS from *E. coli*. This can be achieved by expression of homologous or other heterologous genes.
- 20 In order to convert the GGPP which is now available in increased quantities in the direction of tocopherols and carotenoids, in a further step essential to the invention in addition the activity of the enzyme geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase is increased by overexpression of a corresponding gene. This measure
- 25 achieves an increased production of phytyl pyrophosphate through increased conversion of geranylgeranyl pyrophosphate into phytyl pyrophosphate.

- This is done, for example, by enhanced expression of the GGPPOR
- 30 gene from *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID No. 7) in transgenic plants. In order to ensure plastidic localization, a transit signal sequence is put in front of the *Arabidopsis* GGPPOR. Also suitable as expression cassette is a DNA sequence coding for a GGPPOR gene which hybridizes with SEQ ID No. 7 and which is
- 35 derived from other organisms or from other plants.

Example 15 describes the cloning of the GGPPOR gene from *Arabidopsis thaliana*.

- 40 Increasing the plastidic 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate and phytyl pyrophosphate production leads to increased production of all plastidic isoprenoids, so that sufficient substrate for the production of tocopherols, chlorophylls, vitamin K and phylloquinones is available in the plastids.

45

0817/00006

11

The transgenic plants are produced by transformation of the plants with a construct containing the DOXS and GGPPOR genes. Tobacco and oilseed rape were employed as model plants for the production of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and
5 carotenoids.

The invention also relates to the use of the DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 7, which code for a DOXS or GGPPOR or functional equivalents thereof, for producing plants
10 with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents. The nucleic acid sequences may in these cases be, for example, DNA or cDNA sequences. Coding sequences suitable for insertion into an expression cassette are, for example, those coding for a DOXS or GGPPOR and conferring on the
15 host the ability to overproduce tocopherol.

The expression cassettes additionally comprise regulatory nucleic acid sequences which control the expression of the coding sequence in the host cell. In a preferred embodiment, an
20 expression cassette comprises upstream, i.e. at the 5' end of the coding sequence, a promoter and downstream, i.e. at the 3' end, a polyadenylation signal and, where appropriate, further regulatory elements which are operatively linked to the coding sequence for the DOXS or GGPPOR gene located in between. Operative linkage
25 means sequential arrangement of promoter, coding sequence, terminator and, where appropriate, further regulatory elements in such a way that each of the regulatory elements can properly carry out its function in the expression of the coding sequence. The sequences which are preferred for the operative linkage, but
30 are not restricted thereto, are targeting sequences to ensure subcellular localization in the apoplast, in the vacuole, in plastids, in the mitochondrion, in the endoplasmic reticulum (ER), in the cell nucleus, in elaioplasts or other compartments and translation enhancers such as the 5' leader sequence from
35 tobacco mosaic virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

For example, the plant expression cassette can be incorporated into the tobacco transformation vector pBinAR-Hyg. Fig. 1 shows
40 the tobacco transformation vectors pBinAR-Hyg with the 35S promoter (A) and pBinAR-Hyg with the seed-specific promoter phaseolin 796 (B):

- HPT: hygromycin phosphotransferase
- 45 - OCS: octopine synthase terminator
- PNOS: nopaline synthas promoter

0817/00006

12

- also drawn in are those restriction cleavage sites which cut the vector only once.

Suitable promoters for the expression cassette are in principle all promoters able to control expression of foreign genes in plants. Preferably used is, in particular, a plant promoter or a promoter derived from a plant virus. The CaMV 35S promoter from cauliflower mosaic virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294) is particularly preferred. This promoter contains, as is known, different recognition sequences for transcriptional effectors which, in their totality, lead to permanent and constitutive expression of the inserted gene (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

The expression cassette may also contain a chemically inducible promoter by which expression of the exogenous DOXS or GGPPOR gene in the plant can be controlled at a particular time. Promoters of this type, such as the PRP1 promoter (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), a promoter inducible by salicylic acid (WO 95/19443), a benzenesulfonamide-inducible (EP-A 388186), a tetracycline-inducible (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), an abscisic acid-inducible (EP-A 335528) and an ethanol- or cyclohexanone-inducible (WO 93/21334) promoter, inter alia, can be used.

25

Further particularly preferred promoters are those which ensure expression in tissues or parts of plants in which the biosynthesis of tocopherol or its precursors takes place. Particular mention should be made of promoters which ensure leaf-specific expression. Mention should be made of the promoter of cytosolic FBPase from potato or the ST-LSI promoter from potato (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

An expression cassette is produced by fusing a suitable promoter to a suitable DOXS or GGPPOR DNA sequence and, preferably, to a DNA which is inserted between promoter and DOXS or GGPPOR DNA sequence and which codes for a chloroplast-specific transit peptide, and to a polyadenylation signal, by conventional recombination and cloning techniques as described, for example, in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) and in T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) and in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

0817/00006

13

It is also possible to use expression cassettes whose DNA sequence codes for a DOXS or GGPPOR fusion protein, where part of the fusion protein is a transit peptide which controls translocation of the polypeptide. Transit peptides specific for chloroplasts are particularly preferred, and these are eliminated enzymatically from the DOXS or GGPPOR part after translocation of the DOXS or GGPPOR gene into the chloroplasts. The particularly preferred transit peptide is derived from the plastidic transketolase (TK) or a functional equivalent of this transit peptide (e.g. the transit peptide of the small subunit of rubisco or ferredoxin-NADP oxidoreductase).

The fused expression cassette coding for a DOXS gene or a GGPPOR gene is preferably cloned into a vector, for example pBin19, which is suitable for transforming *Agrobacterium tumefaciens*.

The invention further relates to the use of an expression cassette comprising DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ-ID No. 3 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter for the transformation of plants or cells, tissues or parts of plants. The preferred aim of the use is to increase the tocopherol, vitamin K, chlorophyll and carotenoid contents of the plant.

It is moreover possible, depending on the choice of the promoter, for expression to take place specifically in the leaves, in the seeds or other parts of the plant. The present invention further relates to such transgenic plants, propagation material thereof and cells, tissues or parts of these plants.

The invention additionally relates to transgenic plants transformed with an expression cassette comprising the sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter, and transgenic cells, tissues, parts and propagation material of such plants. Particular preference is given in this connection to transgenic crop plants such as, for example, barley, wheat, rye, corn, oats, soybean, rice, cotton, sugarbeet, canola, sunflower, flax, hemp, potato, tobacco, tomato, oilseed rape, alfalfa, lettuce and the various tree, nut and vine species.

The invention further relates to:

- Process for transforming a plant, which comprises introducing expression cassettes comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or a DNA sequence SEQ ID No. 3 and a SEQ ID No. 7 or DNA

0817/00006

14

sequences hybridizing with the latter into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plants,

- Use of the DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter to produce plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents by expression of a DOXS and a GGPPOR DNA sequence in plants.

10 The object have also been achieved by overexpression of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) gene, a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) gene and a geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) gene in the plants, see Figure 1.

15

In order to increase the metabolite flux from primary metabolism into isoprenoid metabolism, the production of IPP as general starting substrate for all plastidic isoprenoids was increased. For this purpose, the DOXS activity was increased by

20 overexpression of the DOXS from E. coli in transgenic tobacco and oilseed rape plants. This can also be achieved by expressing homologous or other heterologous DOXS genes - such as, for example, a DNA sequence SEQ ID No. 1.

25 The D-1-deoxy-xylulose 5-phosphate which is now available in increased quantities is converted further in the direction of geranylgeranyl pyrophosphate.

In order to convert the GGPP which is now available in increased quantities in the direction of tocopherols and carotenoids, in a further step essential to the invention in addition the activity of the enzyme geranylgeranyl pyrophosphate oxidoreductase is increased by overexpression of a corresponding homologous or heterologous gene. This measure achieves an increased production of phytyl pyrophosphate through increased conversion of geranylgeranyl pyrophosphate into phytyl pyrophosphate.

This done, for example, by enhanced expression of the GGPPOR gene from Arabidopsis thaliana (SEQ ID No. 7) in transgenic plants. In order to ensure plastidic localization, a transit signal sequence is put in front of the Arabidopsis GGPPOR. Also suitable as expression cassette is a DNA sequence coding for a GGPPOR gene which hybridizes with SEQ ID No. 7 and which is derived from other organisms or from other plants.

45

0817/00006

15

Example 15 describes the cloning of the GGPPOR gene from *Arabidopsis thaliana*.

In order to convert the PPP which is now available in increased quantities in the direction of tocopherol and carotenoids, in a further step essential to the invention in addition the activity of the enzyme p-hydroxylphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) is increased by overexpression of a corresponding homologous or heterologous gene. This measure achieves increased production of homogentisic acid by increased conversion of hydroxyphenylpyruvate into homogentisic acid.

cDNAs coding for this enzyme have been described from various organisms such as, for example, from microorganisms, from plants and from humans.

Example 10 describes the cloning of the HPPD gene from *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ ID No. 5). In order to ensure a plastidic localization, a transit signal sequence is put in front of the *Streptomyces* HPPD. Also suitable as expression cassette is a DNA sequence which codes for an HPPD gene which hybridizes with SEQ ID No. 5 and is derived from other organisms or from plants.

The increase in the plastidic D-1-deoxy-xylulose 5-phosphate, the phytyl pyrophosphate and the homogentisic acid production leads to increased production of all plastidic isoprenoids. The increased provision of these precursors ensures that sufficient substrate is available for the production of tocopherols, chlorophylls, vitamin K and phyloquinones in the plastids.

The transgenic plants according to the invention are produced by transforming the plants with a construct containing the DOXS, the HPPD gene and the GGPPOR gene (Example 17). Tobacco and oilseed rape were employed as model plants for producing tocopherols, vitamin K, chlorophylls and carotenoids.

The invention relates to the use of the DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 and SEQ-ID No. 7, which code for a DOXS, an HPPD and a GGPPOR or functional equivalents thereof to produce a plant with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents. The nucleic acid sequences may in these cases be, for example, DNA or cDNA sequences. Coding sequences suitable for insertion into an expression cassette are, for example, those coding for a DOXS, an HPPD and a GGPPOR and conferring on the host the ability to overproduce tocopherol.

0817/00006

16

The expression cassettes additionally comprise regulatory nucleic acid sequences which control the expression of the coding sequence in the host cell. In a preferred embodiment, an expression cassette comprises upstream, i.e. at the 5' end of the coding sequence, a promoter and downstream, i.e. at the 3' end, a polyadenylation signal and, where appropriate, further regulatory elements which are operatively linked to the coding sequence for the DOXS, the HPPD or the GGPPOR gene located in between. Operative linkage means sequential arrangement of promoter, coding sequence, terminator and, where appropriate, further regulatory elements in such a way that each of the regulatory elements can properly carry out its function in the expression of the coding sequence. The sequences which are preferred for the operative linkage, but are not restricted thereto, are targeting sequences to ensure subcellular localization in the apoplast, in the vacuole, in plastids, in the mitochondrion, in the endoplasmic reticulum (ER), in the cell nucleus, in elaioplasts or other compartments and translation enhancers such as the 5' leader sequence from tobacco mosaic virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

For example, the plant expression cassette can be incorporated into the tobacco transformation vector pBinAR-Hyg. Fig. 2 shows the tobacco transformation vectors pBinAR-Hyg with the 35S promoter (A) and pBinAR-Hyg with the seed-specific promoter phaseolin 796 (B):

- HPT: hygromycin phosphotransferase
- OCS: octopine synthase terminator
- 30 - PNOS: nopaline synthase promoter
- also drawn in are those restriction cleavage sites which cut the vector only once.

Suitable promoters for the expression cassette are in principle all promoters able to control expression of foreign genes in plants. Preferably used is, in particular, a plant promoter or a promoter derived from a plant virus. The CaMV 35S promoter from cauliflower mosaic virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294) is particularly preferred. This promoter contains, as is known, different recognition sequences for transcriptional effectors which, in their totality, lead to permanent and constitutive expression of the inserted gene (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

45 The expression cassette may also contain a chemically inducible promoter by which expression of the exogenous DOXS, HPPD and GGPPOR gene in the plant can be controlled at a particular time.

0817/00006

17

Promoters of this type, such as the PRP1 promoter (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), a promoter inducible by salicylic acid (WO 95/19443), a benzenesulfonamide-inducible (EP-A 388186), a tetracycline-inducible (Gatz et al., (1992) 5 Plant J. 2, 397-404), an abscisic acid-inducible (EP-A 335528) and an ethanol- or cyclohexanone-inducible (WO 93/21334) promoter, inter alia, can be used.

Further particularly preferred promoters are those which ensure 10 expression in tissues or parts of plants in which the biosynthesis of tocopherol or its precursors takes place. Particular mention should be made of promoters which ensure leaf-specific expression. Mention should be made of the promoter of cytosolic FBPase from potato or the ST-LSI promoter from potato (Stockhaus 15 et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

An expression cassette is produced by fusing a suitable promoter to a suitable DOXS, HPPD and GGPPOR DNA sequence and, preferably, to a DNA which is inserted between promoter and DOXS, HPPD and 20 GGPPOR DNA sequence and which codes for a chloroplast-specific transit peptide, and to a polyadenylation signal, by conventional recombination and cloning techniques as described, for example, in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring 25 Harbor, NY (1989) and in T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) and in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

30 It is also possible to use expression cassettes whose DNA sequence codes for a DOXS, HPPD and GGPPOR fusion protein, where part of the fusion protein is a transit peptide which controls translocation of the polypeptide. Transit peptides specific for 35 chloroplasts are particularly preferred, and these are eliminated enzymatically from the DOXS, HPPD and GGPPOR part after translocation of the DOXS, HPPD and GGPPOR gene into the chloroplasts. The particularly preferred transit peptide is derived from the plastidic transketolase (TK) or a functional 40 equivalent of this transit peptide (e.g. the transit peptide of the small subunit of rubisco or ferredoxin-NADP oxidoreductase).

The fused expression cassette coding for a DOXS gene, an HPPD gene or a GGPPOR gene is preferably cloned into a vector, for 45 example pBin19, which is suitable for transforming *Agrobacterium tumefaciens*.

0817/00006

18

The invention further relates to the use of an expression cassette comprising DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter for the transformation of plants or cells, tissues or parts of plants. The preferred aim of the use is to increase the tocopherol, vitamin K, chlorophyll and carotenoid contents of the plant.

It is moreover possible, depending on the choice of the promoter, for expression to take place specifically in the leaves, in the seeds or other parts of the plant. The present invention further relates to such transgenic plants, propagation material thereof and cells, tissues or parts of these plants.

The invention additionally relates to transgenic plants transformed with an expression cassette comprising the sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter, and transgenic cells, tissues, parts and propagation material of such plants.

Particular preference is given in this connection to transgenic crop plants such as, for example, barley, wheat, rye, corn, oats, soybean, rice, cotton, sugarbeet, canola, sunflower, flax, hemp, potato, tobacco, tomato, oilseed rape, alfalfa, lettuce and the various tree, nut and vine species.

25

The invention further relates to:

- Processes for transforming a plant, which comprises introducing expression cassettes comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, a DNA sequence SEQ ID No. 5 and a DNA sequence SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plants,
- Use of the DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences hybridizing with the latter to produce plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents by expression of a DOXS, an HPPD and an GGPPOR DNA sequence in plants.

40

It was therefore an additional object of the present invention to develop a test system for identifying DOXS inhibitors.

45

0817/00006

19

This object has been achieved by expressing a DOXS gene from Arabidopsis or E. coli, or DNA sequences hybridizing therewith, and subsequently testing chemicals for inhibition of the DOXS enzyme activity.

5

The transgenic plants are produced by transforming the plants with a construct containing the DOXS gene. Arabidopsis and oilseed rape were employed as model plants for the production of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and carotenoids.

10

Cloning of the complete DOXS gene from Arabidopsis takes place by isolating the cDNA (SEQ ID No. 1) specific for the DOXS gene.

The invention relates to the use of the DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 which codes for a DOXS or functional equivalent thereof for producing a plant with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid content. The nucleic acid sequence can moreover be, for example, a DNA or cDNA sequence. Examples of coding sequences suitable for insertion into an expression cassette are those which code for a DOXS and which confer on the host the ability to overproduce tocopherol.

The expression cassettes additionally comprise regulatory nucleic acid sequences which control the expression of the coding sequence in the host cell. In a preferred embodiment, an expression cassette comprises a promoter upstream, i.e. at the 5' end of the coding sequence, and a polyadenylation signal downstream, i.e. at the 3' end, and, where appropriate, further regulatory elements which are operatively linked to the coding sequence for the DOXS gene located in between. Operative linkage means sequential arrangement of promoter, coding sequence, terminator and, where appropriate, further regulatory elements in such a way that each of the regulatory elements can properly carry out its function in the expression of the coding sequence. The sequences which are preferred for the operative linkage, but are not restricted thereto, are targeting sequences to ensure subcellular localization in the apoplast, in the vacuole, in plastids, in the mitochondrion, in the endoplasmic reticulum (ER), in the cell nucleus, in elaioplasts or other compartments and translation enhancers such as the 5' leader sequence from tobacco mosaic virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 - 8711).

For example, the plant expression cassette can be incorporated into the tobacco transformation vector pBinAR-Hyg. Fig. [lacuna] shows the tobacco transformation vectors pBinAR-Hyg with th 35S

0817/00006

20

promoter (A) and pBinAR-Hyg with the seed-specific promoter phaseolin 796 (B):

- HPT: hygromycin phosphotransferase
- 5 - OCS: octopine synthase terminator
- PNOS: nopaline synthase promoter
- also drawn in are those restriction cleavage sites which cut the vector only once.

10 Suitable promoters for the expression cassette are in principle all promoters able to control expression of foreign genes in plants. Preferably used is, in particular, a plant promoter or a promoter derived from a plant virus. The CaMV 35S promoter from cauliflower mosaic virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294)

15 is particularly preferred. This promoter contains, as is known, different recognition sequences for transcriptional effectors which, in their totality, lead to permanent and constitutive expression of the inserted gene (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

20

The expression cassette may also contain a chemically inducible promoter by which expression of the exogenous DOXS gene in the plant can be controlled at a particular time. Promoters of this type, such as the PRP1 promoter (Ward et al., Plant. Mol. Biol.

25 22 (1993), 361-366), a promoter inducible by salicylic acid (WO 95/19443), a benzenesulfonamide-inducible (EP-A 388186), a tetracycline-inducible (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), an abscisic acid-inducible (EP-A 335528) and an ethanol- or cyclohexanone-inducible (WO 93/21334) promoter, inter alia, can

30 be used.

Further particularly preferred promoters are those which ensure expression in tissues or parts of plants in which the biosynthesis of tocopherol or its precursors takes place. Particular

35 mention should be made of promoters which ensure leaf-specific expression. Mention should be made of the promoter of cytosolic FBPase from potato or the ST-LSI promoter from potato (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

40 It has been possible with the aid of a seed-specific promoter to express a foreign protein stably up to a content of 0.67% of the total soluble seed protein in the seeds of transgenic tobacco plants (Fiedler and Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). The expression cassette can therefore contain, for example, a

45 seed-specific promoter (preferably the phaseolin promoter (US 5504200), the USP (Bauml in, H. et al. Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) or LEB4 promoter (Fiedler and Conrad,

0817/00006

21

1995)), the LEB4 signal peptide, the gene to be expressed, and an ER retention signal. The construction of a cassette of this type is depicted diagrammatically by way of example in Figure 2.

- 5 An expression cassette is produced by fusing a suitable promoter to a suitable DOXS DNA sequence and, preferably, to a DNA which is inserted between promoter and DOXS DNA sequence and which codes for a chloroplast-specific transit peptide, and to a polyadenylation signal, by conventional recombination and cloning techniques as described, for example, in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) and in T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) and in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

- Particularly preferred sequences are those which ensure targeting in the apoplast, in plastids, in the vacuole, in the mitochondrion, in the endoplasmic reticulum (ER) or, due to absence of appropriate operative sequences, ensure retention in the compartment of production, the cytosol (Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996), 285 - 423). Localization in the ER has proved particularly beneficial for the amount of protein accumulated in transgenic plants (Schouten et al., *Plant Mol. Biol.* 30 (1996), 781 - 792).

- It is also possible to use expression cassettes whose DNA sequence codes for a DOXS fusion protein, where part of the fusion protein is a transit peptide which controls translocation of the polypeptide. Transit peptides specific for chloroplasts are particularly preferred, and these are eliminated enzymatically from the DOXS part after translocation of the DOXS gene into the chloroplasts. The particularly preferred transit peptide is derived from the plastidic transketolase (TK) or a functional equivalent of this transit peptide (e.g. the transit peptide of the small subunit of rubisco or ferredoxin-NADP oxidoreductase).

- 40 The inserted nucleotide sequence coding for a DOXS can be prepared by synthesis or be obtained naturally or comprise a mixture of synthetic and natural DNA constituents, and may consist of different heterologous DOXS gene sections from different organisms. In general, synthetic nucleotide sequences are produced with codons preferred by plants. These codons preferred by plants can be identified from codons with the highest protein frequency which are expressed in most plant

0817/00006

22

species of interest. For preparing an expression cassette it is possible to manipulate various DNA fragments in order to obtain a nucleotide sequence which expediently reads in the correct direction and is equipped with a correct reading frame. Adapters or linkers can be attached to the fragments for connecting the DNA fragments to one another.

It is possible and expedient for the promoter and terminator regions to be provided in the direction of transcription with a linker or polylinker which contains one or more restriction sites for inserting this sequence. As a rule, the linker has 1 to 10, usually 1 to 8, preferably 2 to 6, restriction sites. The linker generally has a size of less than 100 bp, frequently less than 60 bp, but at least 5 bp, inside the regulatory regions. The promoter may be both native or homologous and foreign or heterologous to the host plant. The expression cassette comprises in the 5'-3' direction of transcription the promoter, a DNA sequence which codes for a DOXS gene, and a region for termination of transcription. Various termination regions are interchangeable as desired.

It is furthermore possible to employ manipulations which provide appropriate restriction cleavage sites or delete the redundant DNA or restriction cleavage sites. It is possible in relation to insertions, deletions or substitutions, e.g. transitions and transversions, to use *in vitro* mutagenesis, primer repair, restriction or ligation. It is possible with suitable manipulations, e.g. restriction, chewing back or filling in overhangs for blunt ends, to provide complementary ends of the fragments for ligation.

It may be important for success according to the invention inter alia to attach the specific ER retention signal SEKDEL (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), whereby the average level of expression is tripled or quadrupled. It is also possible to employ other retention signals which naturally occur with plant and animal proteins which are localized within the ER for constructing the cassette.

Preferred polyadenylation signals are plant polyadenylation signals, preferably those which essentially correspond to T-DNA polyadenylation signals from *Agrobacterium tumefaciens*, especially of gene 3 of the T-DNA (octopine synthase) of the Ti plasmid pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) or functional equivalents.

0817/00006

23

An expression cassette may comprise, for example, a constitutive promoter (preferably the CaMV 35 S promoter), the LeB4 signal peptide, the gene to be expressed, and the ER retention signal. The ER retention signal preferably used is the amino acid sequence KDEL (lysine, aspartic acid, glutamic acid, leucine).

The fused expression cassette which codes for a DOXS gene is preferably cloned into a vector, for example pBin19, which is suitable for transforming *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* transformed with such a vector can then be used in a known manner for transforming plants, in particular crop plants, e.g. tobacco plants, by, for example, bathing wounded leaves or pieces of leaf in a solution of *agrobacteria* and then cultivating in suitable media. The transformation of plants by *agrobacteria* is disclosed inter alia by F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38. Transgenic plants containing a gene, integrated in the expression cassette, for expression of a DOXS gene can be regenerated in a known manner from the transformed cells of the wounded leaves or pieces of leaf.

For transformation of a host plant with a DNA coding for a DOXS, an expression cassette is incorporated as insertion into a recombinant vector whose vector DNA comprises additional functional regulatory signals, for example sequences for replication or integration. Suitable vectors are described inter alia in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Chap. 6/7, pp. 71-119 (1993).

It is possible by using the recombination and cloning techniques cited above to clone the expression cassettes into suitable vectors which make their replication possible, for example in *E. coli*. Suitable cloning vectors are, inter alia, pBR332, pUC series, M13mp series and pACYC184. Binary vectors able to replicate both in *E. coli* and in *agrobacteria* are particularly suitable.

The invention further relates to the use of an expression cassette comprising a DNA sequence SEQ No. 1 or SEQ ID No. 3; SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5; SEQ ID No. 1 or SEQ-ID No. 3 and SEQ-ID No. 7 or a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7, or DNA sequences hybridizing with the latter for transforming plants, or cells, tissues or parts of plants. The aim of the use is preferably to

0817/00006

24

increase the tocopherol, vitamin K, chlorophyll and carotenoid contents of the plant.

It is moreover possible, depending on the choice of the promoter, for expression to take place specifically in the leaves, in the seeds, or other parts of the plant. The present invention further relates to such transgenic plants, to propagation material thereof and to cells, tissues or parts of the plants.

- 10 The expression cassette can in addition be employed for transforming bacteria, cyanobacteria, yeasts, filamentous fungi and algae with the aim of increasing tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid production.
- 15 The transfer of foreign genes into the genome of a plant is referred to as transformation. In this connection, the described methods for transforming and regenerating plants from plant tissues or plant cells are utilized for transient or stable transformation. Suitable methods are protoplast transformation by
- 20 polyethylene glycol-induced DNA uptake, the biolistic method using the gene gun - called the particle bombardment method, electroporation, incubation of dry embryos in DNA-containing solution, microinjection and gene transfer mediated by *Agrobacterium*. Said processes are described, for example, in
- 25 B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 and in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). The construct to be expressed is preferably cloned into a vector
- 30 which is suitable for transforming *Agrobacterium tumefaciens*, for example pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711).

Agrobacteria transformed with an expression cassette can likewise be used in a known manner for transforming plants, in particular

- 35 crop plants such as cereals, corn, oats, soybean, rice, cotton, sugarbeet, canola, sunflower, flax, hemp, potato, tobacco, tomato, oilseed rape, alfalfa, lettuce and the various tree, nut and vine species, e.g. by bathing wounded leaves or pieces of leaf in a solution of *agrobacteria* and subsequently cultivating
- 40 in suitable media.

Functionally equivalent sequences which code for a DOXS gene are sequences which, despite differing in nucleotide sequence, still have the required functions. Functional equivalents thus comprise

- 45 naturally occurring variants of the sequences described herein, and artificial artificial nucleotide sequences obtained, for

0817/00006

25

example, by chemical synthesis and adapted to the codon usage of a plant.

A functional equivalent also means in particular natural or
 5 artificial mutations of an originally isolated sequence coding for a DOXS, which still show the required function. Mutations comprise substitutions, additions, deletions, transpositions or insertions of one or more nucleotide residues. Thus, the present invention also includes, for example, nucleotide sequences which
 10 are obtained by modifying the DOXS nucleotide sequence. The aim of such a modification may be, for example, to localize further the coding sequence present therein or else, for example, to insert further restriction enzyme cleavage sites.

15 Functional equivalents are also variants whose function is attenuated or enhanced by comparison with the initial gene or gene fragment.

Artificial DNA sequences are also suitable as long as they
 20 confer, as described above, the required property, for example of increasing the tocopherol content in the plant by overexpression of the DOXS gene in crop plants. Such artificial DNA sequences can be identified, for example, by back-translation of proteins which have been constructed by molecular modelling and have DOXS
 25 activity, or by *in vitro* selection. Particularly suitable coding DNA sequences are those which have been obtained by back-translation of a polypeptide sequence in accordance with the codon usage specific for the host plant. The specific codon usage can easily be established by a skilled worker familiar with plant
 30 genetic methods through computer analyses of other, known genes in the plant to be transformed.

Further suitable equivalent nucleic acid sequences which should be mentioned are sequences which code for fusion proteins, in
 35 which case a plant DOXS polypeptide or a functionally equivalent part thereof is a constituent of the fusion protein. The second part of the fusion protein can be, for example, another polypeptide with enzymatic activity, or an antigenic polypeptide sequence with whose aid it is possible to detect DOXS expression
 40 (e.g. myc tag or his tag). However, this is preferably a regulatory protein sequence, e.g. a signal or transit peptide which guides the DOXS protein to the required site of action.

However, the invention also relates to the expression products
 45 generated according to the invention, and to fusion proteins composed of a transit peptide and a polypeptide with DOXS

0817/00006

26

activity.

Incr asing the tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid content means for the purpose of the present invention the artificially acquired capability of increased activity in the biosynthesis of these compounds through functional overexpression of the DOXS gene in the plant compared with the plant which has not been genetically modified, for the duration of at least one plant generation.

10

The site of tocopherol biosynthesis is generally the leaf tissue so that leaf-specific expression of the DOXS gene is sensible. However, it is obvious that tocopherol biosynthesis need not be confined to the leaf tissue, but may also take place tissue-specifically in all other parts of the plant - for example in oilbearing seeds.

Constitutive expression of the exogenous DOXS gene is an additional advantage. However, on the other hand, inducible expression may also appear to be desirable.

The effectiveness of expression of the transgenically expressed DOXS gene can be determined, for example, *in vitro* by shoot meristem propagation. In addition, an alteration in the nature and level of the expression of the DOXS gene and its effect on tocopherol biosynthesis activity can be tested in glasshouse experiments on test plants.

The invention additionally relates to transgenic plants transformed with an expression cassette comprising the sequence SEQ ID No.1 or SEQ ID No. 3; SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ No. 5; SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 7 or a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7, or DNA sequences hybridizing with the latter, and transgenic cells, tissues, parts and propagation material of such plants. Particularly preferred in this connection are transgenic crop plants such as, for example, barley, wheat, rye, corn, oats, soybean, rice, cotton, sugarbeet, canola, sunflower, flax, hemp, potato, tobacco, tomato, oilseed rape, alfalfa, lettuce and the various tree, nut and vine species.

Plants for the purpose of the invention are mono- and dicotyledonous plants or algae.

In order to be able to find efficient DOXS inhibitors, it is necessary to provide suitable test systems with which inhibitor/enzyme binding studies can be carried out. For this purpose, for

0817/00006

27

example, the complete cDNA sequence of DOXS from Arabidopsis is cloned into an expression vector (pQE, Qiagen) and overexpressed in *E. coli*.

- 5 The DOXS protein expressed using the expression cassette is particularly suitable for finding inhibitors specific for DOXS.

For this purpose, DOXS can be employed, for example, in an enzyme assay in which the activity of DOXS is determined in the presence
10 and absence of the active substance to be tested. Comparison of the two activity determinations allows qualitative and quantitative information to be obtained about the inhibitory behavior of the active substance to be tested. Methods for DOXS activity determination are described (Putra et. al., Tetrahedron
15 Letters 39 (1998), 23-26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857-12862).

The test system according to the invention can be used to examine rapidly and simply a large number of chemical compounds for
20 inhibitory properties. The method allows reproducible selection, from a large number of substances, specifically of those with high activity in order subsequently to carry out with these substances further, more intensive tests familiar to the skilled worker.

25

It is possible in principle by overexpression of the gene sequence SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 coding for a DOXS in a plant to achieve increased resistance to DOXS inhibitors. The invention likewise relates to transgenic plants produced in this
30 way.

The invention further relates to:

- A process for transforming a plant, which comprises
35 introducing an expression cassette comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 or a DNA sequence hybridizing with the latter into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plants.
- 40 - The use of a plant for producing plant DOXS.
- The use of the expression cassette comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID NO. 3 or a DNA sequence hybridizing with the latter for producing plants with increased
45 resistance to DOXS inhibitors by enhanced expression of a DNA

0817/00006

28

sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID NO. 3 or a DNA sequence hybridizing with the latter.

- The use of the DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID NO. 3 or of a DNA sequence hybridizing with the latter for producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid content by expression of a DOXS DNA sequence in plants.
- 10 - The use of the expression cassette comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID NO. 3 or a DNA sequence hybridizing with the latter for producing a test system for identifying DOXS inhibitors.
- 15 The invention is illustrated by the examples which now follow, but is not confined to these:

General cloning methods

- 20 The cloning steps carried out for the purpose of the present invention, such as restriction cleavages, agarose gel electrophoresis, purification of DNA fragments, transfer of nucleic acids to nitrocellulose and nylon membranes, linkage of DNA fragments, transformation of *E. coli* cells, cultivation of bacteria, replication of phages and recombinant DNA sequence analysis were carried out as described in Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6).

- The bacterial strains (*E. coli*, XL-I Blue) used below were purchased from Stratagene. The agrobacterium strain used for plant transformation (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 with the plasmid pGV2260 or pGV3850kann) has been described by Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777). Alternative possibilities are also to employ the agrobacterium strain LBA4404 (Clontech) or other suitable strains. Vectors which can be used for cloning are pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103-119), pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8720) and pBinAR (Höfgen and Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230).

Recombinant DNA sequence analysis

- Recombinant DNA molecules were sequenced using a Licor laser fluorescence DNA sequencer (marketed by MWG Biotech, Ebersbach)

0817/00006

29

using the Sanger method (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Example 1

5

Production of the *Arabidopsis thaliana* DOXS transformation constructs

The *Arabidopsis thaliana* DOXS gene was cloned as described in
10 Mandel et al. (1996) as complete cDNA into the vector pBluescript KS- (Stratagene).

To produce overexpression constructs, a 2.3 kb fragment (designated F-23-C) was isolated via the pBluescript KS- HincII
15 (blunt-end) and SacI cleavage sites. This sequence contains the complete DOXS cDNA from the ATG start codon to the EcoRII cleavage site located 80 bp downstream of the stop codon. This fragment was cloned via the SmaI (blunt-end) and SacI cleavage sites into the pBIN19 vector (Figure 3) (Bevan et al., (1980)
20 which contains the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (Franck et al., Cell 21(1), 285-294 (1980)) arranged three times in sequence.

To produce antisense constructs, a region of the 3' end of the
25 cDNA (called F-23-C antisense) was cloned into the abovementioned pBIN19-3X35S vector. Part of the 5' region of the DOXS cDNA in pBluescript KS- was digested via HincII and the DOXS-internal BglII cleavage site, and the resulting fragment was removed. (Figure 4). The BglII cleavage site was filled in by the Klenow
30 fill-in reaction (Klenow polymerase; Roche; after reaction according to manufacturer's protocol) so that a blunt end was produced. The ends which were now compatible (BglII blunt end and HincII) were ligated. The 3' region of the DOXS cDNA was then cloned via KpnI and XbaI (both cleavage sites are located in the
35 polylinker of pBluescript KS-5' and 3' of the DOXS cDNA) in antisense orientation into the pBIN19 vector described above in antisense orientation.

Transformations of *Arabidopsis thaliana* plants with the
40 constructs described above using *Agrobacterium tumefaciens* took place by the vacuum infiltration method (Bent et al., Science 265 (1994), 1856-1860). Several independent transformants were isolated for each construct. Each letter (see Table 1) denotes an independent transformed line. Plants from the T1 generation
45 obtained therefrom were examined for homo- or heterozygosity. Several plants from each line were crossed in order to carry out a segregation analysis. The number in Table 1 corresponds to the

0817/00006

30

individual plant selected for further analyses. Both homo- and heterozygous lines were obtained. The segregation analysis of the resulting lines is shown in Table 1 below:

5 Table 1. Segregation analysis of the transgenic DOXS T2 plants

	LINES	SEGREGATION
	A9	75%
10	A19	100%
	B11	75%
	B4	100%
	C2	100%
15	D3	75%
	D17	100%
	E9	75%
	E14	100%
20	F9	75%
	F14	100%

Example 2

25 Isolation of genomic DNA of the bacterium Escherichia coli XL1 Blue

A culture of Escherichia coli XL1 Blue was grown in 300 ml of Luria broth medium at 37°C for 12 hours. The genomic DNA of the bacterium was isolated from this culture by first pelleting it at 30 5 000 revolutions in a Sorvall RC50 fuge. The pellet was then resuspended in 1/30 of the volume of the original culture of lysis buffer (25 mM EDTA, 0.5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8.0). An equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) was added and incubated at 70 degrees for 10 minutes. The aqueous 35 phase was then separated from the phenolic in a Heraeus floor centrifuge at 3 500 rev for 15 minutes. The aqueous supernatant was mixed with 2.5 volumes of ethanol and 1/10 volume of 8 M lithium chloride, and the nucleic acids were precipitated at room temperature for 10 minutes. The pellet was then taken up in 40 400 µl of TE/RNase and incubated at 37 degrees for 10 minutes. The solution was again shaken with one volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), and the supernatant was precipitated with 2.5 volumes of ethanol and 1/10 volume of 8 M lithium chloride. The pellet was then washed with 80% ethanol and 45 taken up in 400 µl of TE/RNase.

0817/00006

31

Example 3

Isolation of the DOXS from *E. coli*

5 Oligonucleotides for a PCR were derived from the DOXS DNA sequence (Acc. Number AF035440), and a BamHI restriction cleavage site was attached to them at the 5' end, and an XbaI or another BamHI restriction cleavage site was attached to them at the 3' end. The oligonucleotide at the 5' end comprises the sequence
 10 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3' (nucleotides 1-24 of the DNA sequence; in italics) starting with the ATG start codon of the gene, and the oligonucleotide at the 3' end comprises the sequence 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' or
 5'-ATGGATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (nucleotides 1845-1863 of the
 15 reverse complementary DNA sequence; in italics) starting with the stop codon of the gene. The PCR reaction with the two BamHI-containing oligonucleotides was carried out with Pfu polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) in accordance with the manufacturer's information. 500 ng of the genomic DNA from *E.*
 20 *coli* were employed as template. The PCR program was as follows:

5 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;

5 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;

25 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

25

The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg). The correctness of the sequence was established by
 30 sequencing. The fragment was BamHI isolated from the PCR-Script vector and ligated into a correspondingly cut Bin19 vector which additionally contains the transit peptide of potato transketolase downstream of the CaMV 35S as promoter. The transit peptide ensures plastidic localization. The constructs are depicted in
 35 Figure 5 and 6, and the fragments have the following significance:

Fragment A (529 bp) comprises the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (nucleotides 6909 to 7437 of cauliflower mosaic
 40 virus). Fragment B (259 bp) comprises the transit peptide of transketolase. Fragment E comprises the DOXS gene. Fragment D (192 bp) comprises the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) to terminate transcription.

45

0817/00006

32

The PCR reaction with the 5'-BamHI and 3'-XbaI-containing oligonucleotides was carried out with Taq polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) in accordance with the manufacturer's information. 500 ng of the genomic DNA from *E. coli* were employed as template. The PCR program was as follows:

5 cycles: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C
 5 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C
 25 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

10

The fragment was purified using a Gene-Clean kit and ligated into the vector pGemT (Promega GmbH, Mannheim). It was cloned as BamHI/XbaI fragment into a correspondingly cut pBin19AR vector downstream of the CaMV 35S promoter. The sequence was checked by sequencing (SEQ-ID No. 3). This revealed two non-conservative base exchanges which, compared with the published sequence, lead to a change in amino acid 152 (asparagine) to valine and amino acid 330 (cysteine) to tryptophan.

20 Example 4

Detection of increased amounts of DOXS RNA in transgenic plants

Total RNA from 15-day old seedlings of various transgenic lines possessing the DOXS overexpression construct was extracted by the method of Logeman et al., Anal. Biochem. 163, 16-20 (1987), fractionated in a 1.2% agarose gel, transferred to filters and hybridized with a 2.1 kb long DOXS fragment as probe (Figure 7).

30 Example 5

Detection of increased amounts of DOXS protein in transgenic plants

Total protein (Figure 8) from 15-day old seedlings of various independent transgenic plants possessing the DOXS overexpression construct was isolated and detected in a Western analysis using a polyclonal anti-DOXS antibody (IgG) (Figure 9).

40 Example 6

Measurement of the carotenoid and chlorophyll contents

The total amounts of carotenoids and chlorophylls were determined as described by Lichtenthaler and Wellburn (1983) using 100% acetone extracts. The results of the multiple measurements of th

0817/00006

33

transgenic lines possessing the DOXS overexpression construct are shown in Table 2 below.

Table 2: Total carotenoid and chlorophyll contents of transgenic
5 DOXS lines

	LINE	% TOTAL CHLOROPHYLLS	% TOTAL CAROTENOIDS
	clal mutant	5	5
10	Wild type	100	100
	B-4	86	89
	B-11	84	90
	C-2	98	107
15	D-3	128	135
	D-17	136	149
	E-14	121	139
	F-7	80	90
20	F-14	85	107

Example 7

Transformation of oilseed rape

- 25 The production of transgenic oilseed rape plants is based on a protocol of Bade, JB and Damm, B (in Gene, Transfer to Plants, Potrykus, I. and Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in which the composition of the media used are also stated. The transformations took place with
30 the agrobacterium strain LBA4404 (Clontech). The binary vectors used were the pBIN19 constructs with the complete DOXS cDNA already described above. The NOS terminator sequence in these pBIN vectors was replaced by the OCR terminator sequence. Brassica napus seeds were surface-sterilized with 70% (v/v)
35 ethanol, washed in H₂O at 55°C for 10 min, incubated in 1% strength hypochlorite solution (25% v/v Teepol, 0.1% v/v Twenn 20) for 20 min and washed six times with sterile H₂O for 20 min each time. The seeds were dried on filter paper for three days and 10-15 seeds were induced to germinate in a glass flask with
40 15 ml of germination medium. The roots and apices were removed from several seedlings (about 10 cm in size), and the remaining hypocotyls were cut into pieces about 6 mm long. The approx. 600 explants obtained in this way are washed with 50 ml of basal medium for 30 min and transferred into a 300 ml flask. After
45 addition of 100 ml of callus induction medium, the cultures were incubated at 100 rpm for 24 h.

0817/00006

34

An overnight culture of the agrobacterium strain was set up in LB with kanamycin (20 mg/l) at 29°C, and 2 ml of this were incubated in 50 ml of LB without kanamycin at 29°C for 4 h until the OD₆₀₀ was 0.4-0.5. After pelleting of the culture at 2 000 rpm for 5 25 min, the cell pellet was resuspended in 25 ml of basal medium. The concentration of the bacteria in the solution was adjusted to an OD₆₀₀ of 0.3 by adding further basal medium.

The callus induction medium was removed from the oilseed rape 10 explants using sterile pipettes, 50 ml of agrobacterium solution were added and, after cautious mixing, incubated for 20 min. The agrobacteria suspension was removed, the oilseed rape explants were washed with 50 ml of callus induction medium for 1 min and then 100 ml of callus induction medium were added. The 15 cocultivation was carried out on a rotary shaker at 100 rpm for 24 h. The cocultivation was stopped by removing the callus induction medium, and the explants were washed twice for 1 min each time with 25 ml and twice for 60 min with 100 ml each time of washing medium at 100 rpm. The washing medium with the 20 explants was transferred into 15 cm Petri dishes, and the medium was removed using sterile pipettes. For regeneration, in each case 20-30 explants were transferred into 90 mm Petri dishes which contained 25 ml of shoot-induction medium with kanamycin. The Petri dishes were sealed with 2 layers of Leukopor and 25 incubated at 25°C and with 2000 lux in 16/8 H photoperiods. The calli which developed was transferred every 12 days to fresh Petri dishes with shoot-induction medium. All further steps for regenerating whole plants were carried out as described by Bade, J.B. and Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. 30 and Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38).

Example 8

-35- Increasing tocopherol biosynthesis in oilseed rape

The DOXS cDNA (SEQ-ID No. 1) was provided with a CaMV 35S promoter and over-expressed in oilseed rape using the 35S promoter. In parallel with this, the seed-specific promoter of 40 the phaseolin gene was used in order specifically to increase the tocopherol content in the rapeseed. Oilseed rape plants transformed with the corresponding constructs were grown in a glasshouse. The α -tocopherol content of the whole plant and of the seeds of the plant was then determined. In all cases, the 45 α -tocopherol concentration was increased by comparison with the untransformed plant.

0817/00006

35

Example 9

Detection of the expression of DOXS from *E. coli* in transgenic tobacco plants

5

Leaf disks with a diameter of 0.9 cm were taken from completely unfolded leaves of plants containing the construct pBinAR HPPD-DOXS, and were frozen in liquid nitrogen. The leaf material was homogenized in an HEPES-KOH buffer containing proteinase inhibitors, and the protein concentration was determined from the extract using the Bio-Rad protein assay in accordance with the manufacturer's information. 45 µg of protein from each extract were mixed with one volume of loading buffer (Laemmli, 1970) and incubated at 95°C for 5 min. The proteins were then fractionated on a 12.5 percent SDS-PAGE gel. The proteins were then transferred by means of semi-dry electroblots to Porablot membrane (Machery und Nagel). Detection of the DOXS protein took place using a rabbit antibody against *E. coli* DOXS. The color reaction is based on the binding of a secondary antibody and of an alkaline phosphatase which converts NBT/BCIP into a dye. Secondary antibody and alkaline phosphatase were obtained from Pierce, and the procedure was in accordance with the manufacturer's information.

Figure 10 shows the detection of the DOXS protein in leaves of transgenic plants. 1: marker; 2: plant 10; 3:62; 4: 63; 5: 69; 7:71; 8:112; 9:113; 10:116; 11:WT1; 12:WT2; 13:100 ng of recombinant protein; 14:50 ng of recombinant protein; 15: 10 ng of recombinant protein.

30

Example 10

Cloning of an HPPD gene from *Streptomyces avermitilis* U11864

35 Isolation of genomic DNA of the bacterium *Streptomyces avermitilis* U11864:

A culture of *Streptomyces avermitilis* U11864 was grown in 300 ml of YEME medium (5 g of malt extract, 2 g of yeast extract, 2 g of glucose) at 28°C for 96 h. The genomic DNA of the bacterium was isolated from this culture by pelleting it initially at 5000 rev in a Sorvall RC5C fuge. The pellet was then resuspended in 1/30 of the volume of lysis buffer (25 mM EDTA, 0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). An equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) was added and incubated at 70°C for 10 minutes. The aqueous phase was then separated from the phenolic in a Heraeus floor centrifuge at 3 500 rev for 15 minutes. The aqueous

0817/00006

36

supernatant was mixed with 2.5 volumes of ethanol in 1/10 volume of 8 M lithium chloride, and the nucleic acids were precipitated at room temperature for 10 minutes. The pellet was then taken up in 400 µl of TE/RNase and incubated at 37 degrees for 10 minutes.

- 5 The solution was again shaken with one volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), and the supernatant was precipitated with 2.5 volumes of ethanol and 1/10 volume of 8 M lithium chloride. The pellet was then washed with 80% ethanol and taken up in 400 µl of TE/RNase.

10

- Oligonucleotides were derived for a PCR from the DNA sequence of the HPPD from *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., 1994; Acc. Number U11864), and a BamHI restriction cleavage site was attached to the 5' end of them and an XbaI restriction cleavage site was attached at the 3' end of them. The oligonucleotide at the 5' end comprises the sequence 5'-GGATCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (37 to 55 bases distant from the ATG in the 5' direction; in italics), and the oligonucleotide at the 3' end comprises the sequence 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (nucleotides 1845-1863 of the reverse complementary DNA sequence; in italics).

The PCR reaction was carried out with Pfu polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) in accordance with the manufacturer's information. 400 ng of the genomic DNA was employed as pattern.

- 25 The PCR program was as follows:

5 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C
 5 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C
 25 cycles: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

30

The fragment was purified by means of a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg). The correctness of the sequence was checked by sequencing. This revealed that the isolated gene codes for an additional amino acid. It contains the three bases TAC (coding for tyrosine) in front of nucleotide N429 in the quoted sequence (Denoya et al., 1994).

- 40 The fragment was isolated by a BamHI and XbaI digestion from the vector and ligated into a correspondingly cut Bin19AR vector downstream of the CaMV 35S promoter for expression of the gene in the cytosol. The gene was isolated as BamHI fragment from the same PCR-Script vector and was ligated into a correspondingly cut pBin19 vector which additionally comprises the transit peptide of the potato plastidic transketolase downstream of the CaMV 35S promoter. The transit peptide ensures the plastidic localization.

0817/00006

38

The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg). The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was cut as BamHI fragment out of the vector PCR-Script and ligated into a correspondingly cut pBinAR vector which additionally contains the transit peptide of transketolase for introducing the gene product into the plastids. The result was the plasmid pBinAR-TP-HPPD (Figure 12).

10

For the cloning, the 35S promoter, the transketolase transit peptide, the HPPD gene and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al. 1984) for termination of transcription was isolated from the plasmid pBinAR-TP-HPPD by PCR. A HindIII cleavage site was attached in each case to the oligonucleotides for the promoter and the terminator. The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the 5' region of the promoter (in italics) is 5'-ATAAGCTTCATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the termination sequence (in italics) is 5'-ATAAGCTTGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. The resulting fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was transferred as HindIII fragment from this PCR-Script vector into the correspondingly cut vector pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721).

30 The 35S promoter, the transketolase transit peptide, the DOXS gene and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription was isolated by PCR from the plasmid pBinAR-TP-DOXS. An EcoRI cleavage site was attached to each of the oligonucleotides for the promoter and terminator sequence. The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the promoter (in italics) is 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the terminator sequence (in italics) is 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAA-CGGAG-3'. The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg). The correctness of the sequence was checked by sequencing (SEQ ID No. 3). It was transferred as EcoRI fragment from the PCR-Script vector into the correspondingly cut vector pBin19 (Bevan, 1984).

0817/00006

39

It was transferred as XbaI fragment from the PCR-Script vector into the correspondingly cut vector which, as described above, already contains the HPPD sequence. The result was the construct pBinAR-HPPD-DOXS (Figure 13), whose fragments have the following significance:

Fragment A (529 bp) comprises the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (nucleotides 6909 to 7437). Fragment B comprises the transit peptide of plastidic transketolase. Fragment C comprises the HPPD gene. Fragment D comprises the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription. Fragment E comprises the DOXS gene.

15 Example 12

Production of transgenic tobacco plants
(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN)

Transgenic tobacco plants having an altered prenyl lipid content were produced by transforming tobacco leaf disks with DOXS and HPPD sequences. To transform tobacco plants, 10 ml of an *Agrobacterium tumefaciens* overnight culture which had grown under selection were centrifuged, the supernatant was discarded and the bacteria were resuspended in the same volume of antibiotic-free medium. Leaf disks from sterile plants (diameter about 1 cm) were bathed in this bacterial suspension in a sterile Petri dish. The leaf disks were then placed on MS medium (Murashige and Skoog, *Physiol. Plant* (1962) 15, 473) with 2% sucrose and 0.8% Bacto agar in Petri dishes. After incubation in the dark at 25°C for 2 days, they were transferred to MS medium with 100 mg/l kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1 mg/l benzylaminopurine (BAP), 0.2 mg/l naphthylacetic acid (NAA), 1.6% glucose and 0.8% Bacto agar, and the cultivation was continued (16 hours of light/ 8 hours of dark). Growing shoots were transferred to hormone-free MS medium with 2% sucrose, 250 mg/l Claforan and 0.8% Bacto agar.

Example 13

40 Production of transgenic oilseed rape plants (*Brassica napus*)

The production of transgenic oilseed rape plants having an altered prenyl lipid content was based on a protocol by Bade, J.B. and Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, I. and Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag,

0817/00006

40

1995, 30-38), in which the compositions of the media and buffers used are also indicated.

The transformations took place with the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). The binary vectors used were the binary constructs already described above with the total cDNAs of DOXS and HPPD. In all the binary vectors used here, the NOS terminator sequence was replaced by the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription. Brassica napus seeds were surface-sterilized with 70% (v/v) ethanol, washed in H₂O at 55°C for 10 min, incubated in 1% strength hypochlorite solution (25% v/v Teepol, 0.1% v/v Tween 20) for 20 min and washed six times with sterile H₂O for 20 min each time. The seeds were dried on filter paper for three days and 10-15 seeds were induced to germinate in a glass flask with 15 ml of germination medium. The roots and apices were removed from several seedlings (about 10 cm in size), and the remaining hypocotyls were cut into pieces about 6 mm long. The approx. 600 explants obtained in this way are washed with 50 ml of basal medium for 30 min and transferred into a 300 ml flask. After addition of 100 ml of callus induction medium, the cultures were incubated at 100 rpm for 24 h.

An overnight culture of the agrobacterium strain was set up in Luria Broth medium with kanamycin (20 mg/l) at 29°C, and 2 ml of this were incubated in 50 ml of Luria Broth medium without kanamycin at 29°C for 4 h until the OD₆₀₀ was 0.4-0.5. After pelleting of the culture at 2 000 rpm for 25 min, the cell pellet was resuspended in 25 ml of basal medium. The concentration of the bacteria in the solution was adjusted to an OD₆₀₀ of 0.3 by adding further basal medium.

The callus induction medium was removed from the oilseed rape explants using sterile pipettes, 50 ml of agrobacterium solution were added and, after cautious mixing, incubated for 20 min. The agrobacteria suspension was removed, the oilseed rape explants were washed with 50 ml of callus induction medium for 1 min and then 100 ml of callus induction medium were added. The cocultivation was carried out on a rotary shaker at 100 rpm for 24 h. The cocultivation was stopped by removing the callus induction medium, and the explants were washed twice for 1 min each time with 25 ml and twice for 60 min with 100 ml each time of washing medium at 100 rpm. The washing medium with the explants was transferred into 15 cm Petri dishes, and the medium was removed using sterile pipettes.

0817/00006

41

For regeneration, in each case 20-30 explants were transferred into 90 mm Petri dishes which contained 25 ml of shoot-induction medium with kanamycin. The Petri dishes were sealed with 2 layers of Leukopor and incubated at 25°C and with 2 000 lux in 5 photoperiods of 16 hours of light/8 hours of dark. The calli which developed were transferred every 12 days to fresh Petri dishes with shoot-induction medium. All further steps for regenerating whole plants were carried out as described by Bade, J.B. and Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. and 10 Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38).

Example 14

15 Increasing tocopherol biosynthesis in oilseed rape

The cDNA of DOXS (SEQ-ID No. 3) and of HPPD (SEQ-ID No. 5) was provided with a CaMV35S promoter and overexpressed in oilseed rape using the 35S promoter. In parallel with this, the 20 seed-specific promoter of the phaseolin gene was used in order specifically to increase the tocopherol content in the rape seed. Oilseed rape plants transformed with the corresponding constructs were grown in a glasshouse. The α -tocopherol content of the whole plant and of the seeds of the plant was then determined. In all 25 cases, the α -tocopherol concentration was increased by comparison with the untransformed plant.

Example 15

30 Cloning of a GGPPOR gene from Arabidopsis thaliana

Isolation of total RNA from completely unfolded leaves of Arabidopsis thaliana:

35 Completely unfolded leaves of Arabidopsis thaliana were harvested and frozen in liquid nitrogen. The material was then powdered in a mortar and taken up in Z6 buffer (8 M guanidium hydrochloride, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7.0). The suspension was transferred into reaction vessels and shaken with one volume of phenol/ 40 chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1). After centrifugation at 15 000 rpm for 10 minutes, the supernatant was transferred into a new reaction vessel, and the RNA was precipitated with 1/20 volumes of 1N acetic acid and 0.7 volume of ethanol (absolute). After renewed centrifugation, the pellet was first 45 washed with 3M sodium acetate solution and, after a further centrifugation, in 70% ethanol. The pellet was then dissolved in

0817/00006

43

confers on plants resistance to the antibiotic hygromycin and is thus suitable for superinfection of plants with kanamycin resistance. Since the plastid transit peptide of GGPPOR was also cloned, the protein ought to be transported into the plastids in 5 transgenic plants. The construct is depicted in Figure 14. The fragments have the following significance:

Fragment A (529 bp) comprises the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (nucleotides 6909 to 7437 of cauliflower mosaic 10 virus). Fragment D comprises the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription. Fragment F comprises the gene of GGPPOR including the intrinsic plastid transit sequence.

15 Example 16

Production of constructs for transformation of plants with DOXS and GGPPOR sequences

20 To produce plants which are transgenic for DOXS and GGPPOR, a binary vector comprising both gene sequences was manufactured (Figure 15). The GGPPOR gene with the intrinsic plastidic localization sequence was cloned (as described in Example 15) as BamHI/SalI fragment into the correspondingly cut vector 25 pBinAR-Hyg. The DOXS gene was cloned as BamHI fragment as described in Example 3. The vector pBinAR-Hyg contains the 35S promoter of cauliflower mosaic virus and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription. This plasmid 30 confers on plants resistance to the antibiotic hygromycin and is thus suitable for superinfection of plants with kanamycin resistance.

The 35S promoter, the transketolase transit peptide, the DOXS 35 gene and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription was isolated from the plasmid pBinAR-TP-DOXS by PCR. An EcoRI cleavage site was attached in each case to the oligonucleotides for the promoter and the terminator sequence. 40 The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the promoter (in italics) is 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the terminator sequence (in italics) is 5'-ATGAATTCCGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, 45 Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by

0817/00006

44

sequencing. It was transferred from the PCR-Script vector as EcoRI fragment into the correspondingly cut vector pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Res. 12 (1984), 8711-8721).

- 5 The 35S promoter, the GGPPOR gene and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription was isolated from the plasmid pBinARHyg-GGPPOR by PCR. An XbaI cleavage site was attached in each case to the oligonucleotides for the promoter
- 10 and the terminator. The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the promoter (in italics) is 5'-ATTCTAGACATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the terminator sequence (in italics) is 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. The fragment
- 15 was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information onto the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was transferred from the PCR-Script vector as XbaI fragment into the
- 20 correspondingly cut vector which already contained, as described above, the DOXS sequence. The result was the construct pBinAR-DOXS-GGPPOR (Figure 15), whose fragments have the following significance:
- 25 Fragment A (529 bp) comprises the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (nucleotides 6909 to 7437 of cauliflower mosaic virus). Fragment B comprises the transit peptide of the plastidic transketolase. Fragment E comprises the DOXS gene. Fragment D comprises the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of
- 30 the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription. Fragment F comprises the GGPPOR gene including the intrinsic plastid transit sequence.

Example 17

35

Production of constructs for transformation of plants with DOXS, GGPPOR and HPPD DNA sequences

- To produce plants which are transgenic for DOXS, GGPPOR and HPPD,
- 40 a binary vector containing all three gene sequences was manufactured (Figure 16). The GGPPOR gene was provided with the intrinsic plastidic localization sequence (as described in Example 15). The pBinAR-Hyg vector used confers on plants resistance to the antibiotic hygromycin and is thus suitable for
- 45 superinfection of plants with kanamycin resistance.

0817/00006

45

To clone HPPD into vectors which additionally contain another cDNA, oligonucleotides were derived for a PCR, and a BamHI restriction cleavage site was attached to them at the 5' end and 3' end. The oligonucleotide at the 5' end comprises the sequence
 5' -GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (nucleotides 37 to 55 distant from ATG in the 5' direction; in italics), and the oligonucleotide at the 3' end comprises the sequence
 5' -ATGGATCCCGCGCCGCTACAGGTTG-3' (ending with base pair 1140 of the coding sequence, starting 8 base pairs 3' of the TAG stop codon; in italics). The PCR reaction was carried out with Tli polymerase from Promega GmbH, Mannheim in accordance with the manufacturer's information. 10 ng of the plasmid pBinAR-HPPD were employed as template. The PCR program was as follows:

15 5 cycles: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min
 5 cycles: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
 25 cycles: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was cut out of the vector PCR-Script as BamHI fragment and ligated into a correspondingly cut pBinAR vector
 20 which additionally contains the transit peptide of transketolase for introducing the gene product into plastids. The result was the plasmid pBinAR-TP-p-HPPD.

For the cloning, the 35S promoter, the transketolase transit peptide, the p-HPPD gene and the polyadenylation signal of gene 3
 30 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al. 1984) for termination of transcription was isolated from the plasmid pBinAR-TP-p-HPPD by PCR. A HindIII cleavage site was attached in each case to the oligonucleotides for the promoter and the
 35 terminator. The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the 5' region of the promoter (in italics) is
 5' -ATAAGCTTCATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the termination sequence (in italics) is 5' -ATAAGCTTGGAC-AATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. The
 40 resulting fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was transferred as HindIII fragment from this
 45 PCR-Script vector into the correspondingly cut vector pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721).

0817/00006

46

The 35S promoter, the transketolase transit peptide, the DOXS gene and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription was isolated from the plasmid pBinAR-TP-DOXS by PCR. An EcoRI cleavage site was attached in each case to the oligonucleotides for the promoter and the terminator sequence. The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the promoter (in italics) is 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the terminator sequence (in italics) is 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was transferred from the PCR-Script vector as EcoRI fragment into the correspondingly cut vector which already contained the HPPD sequence as described above.

The 35S promoter, the GGPPOR gene and the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription was isolated from the plasmid pBinARHyg-GGPPOR by PCR. An XbaI cleavage site was attached in each case to the oligonucleotides for the promoter and the terminator. The sequence of the oligonucleotide which anneals onto the promoter (in italics) is 5'-ATTCTAGACATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', and that of the oligonucleotide which anneals onto the terminator sequence (in italics) is 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. The fragment was purified using a Gene-Clean kit (Dianova GmbH, Hilden) and cloned in accordance with the manufacturer's information into the vector PCR-Script from Stratagene GmbH, Heidelberg. The correctness of the sequence was checked by sequencing. It was transferred from the PCR-Script vector as XbaI fragment into the correspondingly cut vector which already contained the HPPD and DOXS sequences as described above. The result was the construct pBinAR-DOXS-GGPPOR-HPPD (Figure 16), whose fragments have the following significance:

Fragment A (529 bp) comprises the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (nucleotides 6909 to 7437 of cauliflower mosaic virus). Fragment B comprises the transit peptide of the plastidic transketolase. Fragment C comprises the HPPD gene. Fragment D comprises the polyadenylation signal of gene 3 of the T DNA of the Ti plasmid pTIACH5 (Gielen et al., 1984) for termination of transcription. Fragment E comprises the DOXS gene. Fragment F

0817/00006

47

comprises the GGPPOR gene including the intrinsic plastid transit sequence.

Example 18

5

Increasing tocopherol biosynthesis in oilseed rape

The cDNA of DOXS (SEQ ID No. 3) and of GGPPOR (SEQ ID No. 7) was provided with a CaMV35S promoter and overexpressed in rape using 10 the 35S promoter. In parallel with this, the seed-specific promoter of the phaseolin gene was used in order specifically to increase the tocopherol content in the rapeseed. Oilseed rape plants transformed with the corresponding constructs were grown in a glasshouse. The α -tocopherol content of the whole plant and 15 of the seeds of the plant was then determined. In all cases, the α -tocopherol concentration was increased by comparison with the untransformed plant.

Example 19

20

Increasing the tocopherol biosynthesis in oilseed rape

The cDNA of DOXS (SEQ ID No. 3), of HPPD (SEQ ID No. 5) and of GGPPOR (SEQ-ID No. 7) was provided with a CaMV35S promoter and 25 overexpressed in rape using the 35S promoter. In parallel with this, the seed-specific promoter of the phaseolin gene was used in order specifically to increase the tocopherol content in the rapeseed. Oilseed rape plants transformed with the corresponding constructs were grown in a glasshouse. The α -tocopherol content 30 of the whole plant and of the seeds of the plant was then determined. In all cases, the α -tocopherol concentration was increased by comparison with the untransformed plant.

35

40

45

W claim:

1. The use of DNA sequences coding for a
5 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) for producing
plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll
and/or carotenoid contents.
2. The use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 or of
10 a DNA sequence which hybridizes with the latter and codes for
a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) for
producing plants with increased content of tocopherols,
vitamin K, chlorophylls and/or carotenoids.
- 15 3. The use of DNA sequences coding for a
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and coding for
a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) for producing
plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll
and/or carotenoid contents.
20
4. The use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and of
a DNA sequence SEQ ID No. 5 or of a DNA sequence which
hybridizes with the latter and codes for a
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and a
25 p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase for producing plants with
increased content of tocopherols, vitamin K, chlorophylls
and/or carotenoids.
5. The use of DNA sequences coding for a
30 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and coding for
a geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) for
producing plants with increased tocopherol, vitamin K,
chlorophyll and/or carotenoid contents.
- 35 6. The use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and of
a DNA sequence SEQ ID No. 7 or of a DNA sequence which
hybridizes with the latter and codes for a
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and a
geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) for
40 producing plants with increased tocopherol, vitamin K,
chlorophyll and/or carotenoid contents.
7. The use of DNA sequences coding for a
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS) and coding for
45 a hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) and coding for a
geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) for

49

producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents.

8. The use of a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and of
5 a DNA sequence SEQ ID No. 5 and of a DNA sequence SEQ ID No. 7 or of a DNA sequence which hybridizes with the latter and codes for a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DOXS), a hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) and a geranylgeranyl-pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR) for
10 producing plants with increased content of tocopherols, vitamin K, chlorophylls and/or carotenoids.
9. A process for producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents, which
15 comprises expressing a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 or a DNA sequence which hybridizes with the latter in plants.
10. A process for producing plants with increased tocopherol,
20 vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents, which comprises expressing a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and a DNA sequence SEQ ID No. 5 or DNA sequences which hybridize with the latter in plants.
- 25 11. A process for producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents, which comprises expressing a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and a DNA sequence SEQ ID No. 7 or DNA sequences which hybridize with the latter in plants.
30
12. A process for producing plants with increased tocopherol, vitamin K, chlorophyll and/or carotenoid contents, which comprises expressing DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7 or DNA sequences which
35 hybridize with the latter in plants.
13. A process for transforming a plant, which comprises introducing an expression cassette comprising a promoter and a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 into a plant
40 cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plant cells.
14. A process for transforming a plant, which comprises introducing an expression cassette comprising a promoter and
45 DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 5

0817/00006

50

into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plant cells.

15. A process for transforming a plant, which comprises
5 introducing an expression cassette comprising a promoter and DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 7 into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plant cells.
- 10 16. A process for transforming a plant, which comprises introducing an expression cassette comprising a promoter and DNA sequences SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 and SEQ ID No. 7 into a plant cell, into callus tissue, a whole plant or protoplasts of plant cells.
- 15 17. A process for transforming plants as claimed in claim 13-16, wherein the transformation takes place with the aid of the strain *Agrobacterium tumefaciens*, of electroporation or of the particle bombardment method.
- 20 18. A plant transformed with an expression cassette as set forth in claim 13-16.
19. A plant as claimed in claim 18 selected from the group of
25 soybean, canola, barley, oats, wheat, oilseed rape, corn or sunflower.
20. The use of SEQ ID No. 1 or SEQ-ID No. 3 for producing a test system for identifying DOXS inhibitors
- 30 21. A test system based on the expression of an expression cassette as set forth in claim 13 for identifying DOXS inhibitors.
- 35 22. The use of a plant comprising a DNA sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3 or a DNA sequence which hybridize with the latter for producing plant and bacterial DOXS.

40

45

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KG&A

<120> DNA-Sequenz kodierend fuer eine
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

<130> 0050/49249

<140> 0817 - 00006

<141> 1999-08-04

<160> 8

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2458

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2154)

<400> 1

atg gct tct tct gca ttt gct ttt cct tct tac ata ata acc aaa gga	48
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly	
1 5 10 15	

gga ctt tca act gat tct tgt aaa tca act tct ttg tct tct tct aga	96
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg	
20 25 30	

tct ttg gtt aca gat ctt cca tca cca tgt ctg aaa ccc aac aac aat	144
Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn	
35 40 45	

tcc cat tca aac aga aga gca aaa gtg tgt gct tca ctt gca gag aag	192
Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys	
50 55 60	

ggt gaa tat tat tca aac aga cca cca act cca tta ctt gac act att	240
Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile	
65 70 75 80	

aac tac cca atc cac atg aaa aat ctt tct gtc aag gaa ctg aaa caa	288
Asn Tyr Pr Il His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu L u Lys Gln	

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

85	90	95	
ctt tct gat gag ctg aga tca gac gtg atc ttt aat gtg tcg aaa acc			336
Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr			
100	105	110	
ggt gga cat ttg ggg tca agt ctt ggt gtt gtg gag ctt act gtg gct			384
Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala			
115	120	125	
ctt cat tac att ttc aat act cca caa gac aag att ctt tgg gat gtt			432
Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val			
130	135	140	
ggt cat cag tct tat cct cat aag att ctt act ggg aga aga gga aag			480
Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys			
145	150	155	160
atg cct aca atg agg caa acc aat ggt ctc tct ggt ttc acc aaa cga			528
Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg			
165	170	175	
gga gag agt gaa cat gat tgc ttt ggt act gga cac agc tca acc aca			576
Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr			
180	185	190	
ata tct gct ggt tta gga atg gcg gta gga agg gat ttg aag ggg aag			624
Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys			
195	200	205	
aac aac aat gtg gtt gct gtg att ggt gat ggt gcg atg acg gca gga			672
Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly			
210	215	220	
cag gct tat gaa gcc atg aac aac gcc gga tat cta gac tct gat atg			720
Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met			
225	230	235	240
att gtg att ctt aat gac aac aag caa gtc tca tta cct aca gct act			768
Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr			
245	250	255	
ttg gat gga cca agt cca cct gtt ggt gca ttg agc agt gct ctt agt			816
Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser			
260	265	270	
cgg tta cag tct aac ccg gct ctc aga gag ttg aga gaa gtc gca aag			864
Arg Leu Gln S r Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys			

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

275	280	285	
ggt atg aca aag caa ata ggc gga cca atg cat cag ttg gcg gct aag			912
Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys			
290	295	300	
gta gat gtg tat gct cga gga atg ata agc ggt act gga tcg tca ctg			960
Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu			
305	310	315	320
ttt gaa gaa ctc ggt ctt tac tat att ggt cca gtt gat ggg cac aac			1008
Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn			
325	330	335	
ata gat gat ttg gta gcc att ctt aaa gaa gtt aag agt acc aga acc			1056
Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr			
340	345	350	
aca gga cct gta ctt att cat gtg gtg acg gag aaa ggt cgt ggt tat			1104
Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr			
355	360	365	
cct tac gcg gag aga gct gat gac aaa tac cat ggt gtt gtg aaa ttt			1152
Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe			
370	375	380	
gat cca gca acg ggt aga cag ttc aaa act act aat gag act caa tct			1200
Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser			
385	390	395	400
tac aca act tac ttt gcg gag gca tta gtc gca gaa gca gag gta gac			1248
Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp			
405	410	415	
aaa gat gtg gtt gcg att cat gca gcc atg gga ggt gga acc ggg tta			1296
Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu			
420	425	430	
aat ctc ttt caa cgt cgc ttc cca aca aga tgt ttc gat gta gga ata			1344
Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile			
435	440	445	
gcg gaa caa cac gca gtt act ttt gct gcg ggt tta gcc tgt gaa ggc			1392
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly			
450	455	460	
ctt aaa ccc ttc tgt gca atc tat tcg tct ttc atg cag cgt gct tat			1440
Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr			

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

465	470	475	480	
gac cag gtt gtc cat gat gtt gat ttg caa aaa tta ccg gtg aga ttt				1488
Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe				
485	490	495		
gca atg gat aga gct gga ctc gtt gga gct gat ggt ccg aca cat tgt				1536
Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys				
500	505	510		
gga gct ttc gat gtg aca ttt atg gct tgt ctt cct aac atg ata gtg				1584
Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val				
515	520	525		
atg gct cca tca gat gaa gca gat ctc ttt aac atg gtt gca act gct				1632
Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala				
530	535	540		
gtt gcg att gat gat cgt cct tct tgt ttc cgt tac cct aga ggt aac				1680
Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn				
545	550	555	560	
ggt att gga gtt gca tta cct ccc gga aac aaa ggt gtt cca att gag				1728
Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu				
565	570	575		
att ggg aaa ggt aga att tta aag gaa gga gag aga gtt gcg ttg ttg				1776
Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu				
580	585	590		
ggt tat ggc tca gca gtt cag agc tgt tta gga gcg gct gta atg ctc				1824
Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu				
595	600	605		
gaa gaa cgc gga tta aac gta act gta gcg gat gca cgg ttt tgc aag				1872
Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys				
610	615	620		
cca ttg gac cgt gct ctc att cgc agc tta gct aag tcg cac gag gtt				1920
Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val				
625	630	635	640	
ctg atc acg gtt gaa gaa ggt tcc att gga ggt ttt ggc tcg cac gtt				1968
Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val				
645	650	655		
gtt cag ttt ctt gct ctc gat ggt ctt ctt gat ggc aaa ctc aag tgg				2016
Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp				

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

660	665	670	
aga cca atg gta ctg cct gat cga tac att gat cac ggt gca cca gct			2064
Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala			
675	680	685	
gat caa cta gct gaa gct gga ctc atg cca tct cac atc gca gca acc			2112
Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr			
690	695	700	
gca ctt aac tta atc ggt gca cca agg gaa gct ctg ttt tga			2154
Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe			
705	710	715	
gagtaagaat ctgttggtta aaacataatgt atacaaacac tctaaatgca acccaagggtt 2214			
tcttctaagt actgatcaga attcccgccc gagaagtcct ttggcaacag ctatatatat 2274			
ttactaagat tgtgaagaga aaggcaaagg caaagggttg gcaaagatta gtattataga 2334			
taaaactggt atttggtttg taattttagg attgtgatga gatcgtgttg taccaataac 2394			
taacatcttg taaaatcaat tactctcttg tgatcttcaa taagcttgag tgacaaaaaa 2454			
aaaa 2458			

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly

1

5

10

15

Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg

20

25

30

Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn

35

40

45

Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys

50

55

60

Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pr Leu Leu Asp Thr Ile

65

70

75

80

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln
 85 90 95
 Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr
 100 105 110
 Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala
 115 120 125
 Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val
 130 135 140
 Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys
 145 150 155 160
 Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg
 165 170 175
 Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr
 180 185 190
 Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys
 195 200 205
 Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly
 210 215 220
 Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met
 225 230 235 240
 Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr
 245 250 255
 Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser
 260 265 270
 Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys
 275 280 285
 Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys
 290 295 300
 Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn
 325 330 335

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr
 340 345 350

Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr
 355 360 365

Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe
 370 375 380

Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser
 385 390 395 400

Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp
 405 410 415

Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu
 420 425 430

Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
 435 440 445

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
 450 455 460

Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr
 465 470 475 480

Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
 485 490 495

Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
 500 505 510

Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
 515 520 525

Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
 530 535 540

Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 545 550 555 560

Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
 565 570 575

Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
 580 585 590

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
 595 600 605

Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
 610 615 620

Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
 625 630 635 640

Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
 645 650 655

Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
 660 665 670

Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
 675 680 685

Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
 690 695 700

Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
 705 710 715

<210> 3

<211> 1863

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1863)

<400> 3

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48
 Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1 5 10 15

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96
 Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg 144
 Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His	
50 55 60	
tat gtc tac aac acc ccg ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat	240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His	
65 70 75 80	
cag gct tat ccg cat aaa att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc	288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly	
85 90 95	
acc atc cgt cag aaa ggc ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa	336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu	
100 105 110	
agc gaa tat gac gta tta agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt	384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser	
115 120 125	
gcc gga att ggt att gcg gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc	432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg	
130 135 140	
cgc acc gtc tgt gtc att ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg	480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala	
145 150 155 160	
ttt gaa gcg atg aat cac gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg	528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val	
165 170 175	
att ctc aac gac aat gaa atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc	576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu	
180 185 190	
aac aac cat ctg gca cag ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg	624
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu	
195 200 205	
cgc gaa ggc ggg aaa aaa gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag	672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu	
210 215 220	
ctg ctc aaa cgc acc gaa gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc	720
L u Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly	
225 230 235 240	
acg ttg ttt gaa gag ctg ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt	768

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly	
245 250 255	
cac gat gtg ctg ggg ctt atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg	816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu	
260 265 270	
aaa ggc ccg cag ttc ctg cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat	864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr	
275 280 285	
gaa ccg gca gaa aaa gac ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt	912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe	
290 295 300	
gat ccc tcc agc ggt tgt ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc	960
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser	
305 310 315 320	
tat tca aaa atc ttt ggc gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac	1008
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp	
325 330 335	
aac aag ctg atg gcg att act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg	1056
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met	
340 345 350	
gtc gag ttt tca cgt aaa ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att	1104
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile	
355 360 365	
gcc gag caa cac gcg gtg acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg	1152
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly	
370 375 380	
tac aaa ccc att gtc gcg att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat	1200
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr	
385 390 395 400	
gat cag gtg ctg cat gac gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc	1248
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe	
405 410 415	
gcc atc gac cgc gcg ggc att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag	1296
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln	
420 425 430	
ggg gct ttt gat ctc tct tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att	1344

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
 435 440 445

atg acc ccg agc gat gaa aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc 1392
 Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
 450 455 460

tat cac tat aac gat ggc ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac 1440
 Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 465 470 475 480

gcg gtc ggc gtg gaa ctg acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa 1488
 Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
 485 490 495

ggc att gtg aag cgt cgt ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt 1536
 Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
 500 505 510

acg ctg atg cca gaa gcg gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg 1584
 Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
 515 520 525

ctg gtc gat atg cgt ttt gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg 1632
 Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
 530 535 540

gaa atg gcc gcc agc cat gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc 1680
 Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
 545 550 555 560

att atg ggc ggc gca ggc agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat 1728
 Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575

cgt aaa cca gta ccc gtg ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att 1776
 Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590

ccg caa gga act cag gaa gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc 1824
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605

gct ggt atg gaa gcc aaa atc aag gcc tgg ctg gca taa 1863
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

<210> 4

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1 5 10 15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
 50 55 60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
 65 70 75 80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
 85 90 95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
 100 105 110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
 115 120 125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
 130 135 140

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
 145 150 155 160

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
 165 170 175

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
 180 185 190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
 195 200 205

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
 210 215 220

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
 225 230 235 240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
 245 250 255

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
 260 265 270

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
 275 280 285

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
 290 295 300

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
 305 310 315 320

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
 325 330 335

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
 340 345 350

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
 355 360 365

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
 370 375 380

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
 385 390 395 400

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
 405 410 415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
 420 425 430

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
 435 440 445

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
 450 455 460

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 465 470 475 480

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
 485 490 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
 500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
 515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
 530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
 545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

<210> 5

<211> 1469

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(1138)

<400> 5

gatatccgag cgccgccggg tccactgcgg tccgaagccg cggatgactc cattcgactg 60

aagccgggtcg agccgcgcct gcacgggtgcc gcgcgcgacc ccgagccgcc gggacatctc 120

gagcactccg atgcgcggct cccgcgccag cagcaccagg agccggccgt ccagatgac 180

gatcgccacg gcagcccctc cagtggatcat cctgtac atg cag ccc cac gcc atg 235

Met Gln Pro His Ala Met

1

5

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

ggc ggt gca ctg aac aca ttg tcc agc gga caa gcc aac tat tgc gca 283
 Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala
 10 15 20

cct tgc gga acg gag cga ccc tgc cgc cat gac gca gac cac aca cca 331
 Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro
 25 30 35

cac tcc cga cac cgc ccg gca ggc cga ccc ctt ccc ggt gaa ggg aat 379
 His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn
 40 45 50

gga cgc ggt cgt ctt cgc cgt agg caa cgc caa gca ggc cgc gca cta 427
 Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg Gln Ala Gly Arg Ala Leu
 55 60 65 70

ctc cac cgc ctt cgg cat gca gct tgt ggc gta ctc cgg acc gga gaa 475
 Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly Val Leu Arg Thr Gly Glu
 75 80 85

cgg cag ccg cga gac cgc ttc gta cgt cct cac caa cgg ctc ggc acg 523
 Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro His Gln Arg Leu Gly Thr
 90 95 100

ctt cgt cct cac ctc cgt cat caa gcc cgc cac ccc ctg ggg cca ctt 571
 Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg His Pro Leu Gly Pro Leu
 105 110 115

cct cgc cga cca tgt ggc cga gca cgg cga cgg cgt cgt cga cct cgc 619
 Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg
 120 125 130

cat cga ggt ccc gga cgc ccg cgc cgc cca cgc gta cgc gat cga gca 667
 His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro Arg Val Arg Asp Arg Ala
 135 140 145 150

cgg cgc ccg ctc ggt cgc cga gcc gta cga gct gaa gga cga gca cgg 715
 Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg Ala Glu Gly Arg Ala Arg
 155 160 165

cac ggt cgt cct cgc cgc gat cgc cac cta cgg caa gac ccg cca cac 763
 His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu Arg Gln Asp Pro Pro His
 170 175 180

cct cgt cga ccg gac cgg cta cga cgg ccc cta cct ccc cgg cta cgt 811
 Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro Leu Pro Pro Arg Leu Arg
 185 190 195

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

ggc cgc cgc ccc gat cgt cga acc gcc cgc cca ccg cac ctt cca ggc 859
 Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg Pro Pro His Leu Pro Gly
 200 205 210

cat cga cca ctg cgt cgg caa cgt cga gct cgg ccg gat gaa cga atg 907
 His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Arg Met
 215 220 225 230

ggt cgg ctt cta caa caa ggt cat ggg ctt cac gaa cat gaa gga gtt 955
 Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu His Glu His Glu Gly Val
 235 240 245

cgt ggg cga cga cat cgc gac cga gta ctc ggc gct gat gtc gaa ggt 1003
 Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu Gly Ala Asp Val Glu Gly
 250 255 260

cgt ggc cga cgg cac gct caa ggt caa gtt ccc gat caa cga gcc cgc 1051
 Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val Pro Asp Gln Arg Ala Arg
 265 270 275

cct cgc caa gaa gaa gtc cca gat cga cga gta cct gga gtt cta cgg 1099
 Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg Val Pro Gly Val Leu Arg
 280 285 290

cgg cgc ggg cgt cca gca cat cgc gct gaa cac ggg tga catcgtcgag 1148
 Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu His Gly
 295 300 305

acgggtacgca cgaatgcgcgc cgccggcgtc cagttcctgg acacgcccga ctcgtactac 1208

gacaccctcg gggagtgggt gggcgacacc cgcgtccccg tcgacaccct gcgcgagctg 1268

aagatcctcg cggaccgcga cgaggacggc tatctgctcc agatcttcac caagccggtc 1328

caggaccgcc cgacggtctt cttcgagatc atcgaacgcc acggctcgat gggattcggc 1388

aagggcaact tcaaggccct gttcgaggcg atcgagcggg agcaggagaa gcggggcaac 1448

ctgtaggcgg cgcgcccgg g 1469

<210> 6

<211> 306

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6

Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

1	5	10	15
Gln Ala Asn Tyr Cys Ala Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His	20	25	30
Asp Ala Asp His Thr Pro His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro	35	40	45
Leu Pro Gly Glu Gly Asn Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg	50	55	60
Gln Ala Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly	65	70	75
Val Leu Arg Thr Gly Glu Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro	85	90	95
His Gln Arg Leu Gly Thr Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg	100	105	110
His Pro Leu Gly Pro Leu Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg	115	120	125
Arg Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro	130	135	140
Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg	145	150	155
Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu	165	170	175
Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro	180	185	190
Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg	195	200	205
Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala	210	215	220
Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu	225	230	235
His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu	245	250	255
Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val			

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

260	265	270
Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg		
275	280	285
Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu		
290	295	300
His Gly		
305		
<210> 7		
<211> 1479		
<212> DNA		
<213> Arabidopsis thaliana		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(1401)		
<400> 7		
atg gcg acg acg gtt aca ctc aaa tcc ttc acc gga ctt cgt caa tca	48	
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser		
1 5 10 15		
tca acg gag caa aca aac ttc gtc tct cat gta ccg tca tca ctt tct	96	
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser		
20 25 30		
ctc cct caa cga cgg acc tct ctc cga gta acc gca gcc agg gcc act	144	
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr		
35 40 45		
ccc aaa ctc tcc aac cgt aaa ctc cgt gtc gcc gtc atc ggt ggt gga	192	
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly		
50 55 60		
cca gca ggc ggg gca gct gca gag act cta gca caa gga gga atc gag	240	
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu		
65 70 75 80		
acg att ctc atc gag cgt aag atg gac aat tgc aag cct tgc ggt ggc	288	
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly		
85 90 95		
gcg att cct ctc tgt atg gtc gga gaa ttc aac ttg ccg ttg gat att	336	
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile		

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

100	105	110	
att gat cgg aga gtg acg aag atg aag atg att tcg ccg tcg aac att			384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile			
115	120	125	
gct gtt gat att ggt cgt acg ctt aag gag cat gag tat ata ggt atg			432
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met			
130	135	140	
gtg aga aga gaa gtt ctt gat gct tat ctg aga gag aga gct gag aag			480
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys			
145	150	155	160
agt gga gcc act gtg att aac ggt ctc ttc ctt aag atg gat cat ccg			528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro			
165	170	175	
gag aat tgg gac tcg ccg tac act ttg cat tac act gag tac gat ggt			576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly			
180	185	190	
aaa act gga gct aca ggg acg aag aaa aca atg gag gtt gat gct gtc			624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val			
195	200	205	
att gga gct gat gga gct aac tct agg gtt gct aaa tct att gat gct			672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala			
210	215	220	
ggt gat tac gac tac gca att gca ttt cag gag agg att agg att cct			720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro			
225	230	235	240
gat gag aaa atg act tac tat gag gat tta gct gag atg tat gtt gga			768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly			
245	250	255	
gat gat gtg tcg ccg gat ttc tat ggt tgg gtg ttc cct aag tgc gac			816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp			
260	265	270	
cat gta gct gtt gga aca ggt act gtg act cac aaa ggt gac atc aag			864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys			
275	280	285	
aag ttc cag ctc gcg acc aga aac aga gct aag gac aag att ctt gga			912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly			

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

290	295	300	
ggg aag atc atc cgt gtg gag gct cat ccg att cct gaa cat ccg aga			960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg			
305	310	315	320
cca cgt agg ctc tcg aaa cgt gtg gct ctt gta ggt gat gct gca ggg			1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly			
	325	330	335
tat gtg act aaa tgc tct ggt gaa ggg atc tac ttt gct gct aag agt			1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser			
	340	345	350
gga aga atg tgt gct gaa gcc att gtc gaa ggt tca cag aat ggt aag			1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys			
	355	360	365
aag atg att gac gaa ggg gac ttg agg aag tac ttg gag aaa tgg gat			1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp			
	370	375	380
aag aca tac ttg cct acc tac agg gta ctt gat gtg ttg cag aaa gtg			1200
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val			
	385	390	400
ttt tac aga tca aat ccg gct aga gaa gcg ttt gtg gag atg tgt aat			1248
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn			
	405	410	415
gat gag tat gtt cag aag atg aca ttc gat agc tat ctg tac aag cgg			1296
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg			
	420	425	430
gtt gcg ccg ggt agt cct ttg gag gat atc aag ttg gct gtg aac acc			1344
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr			
	435	440	445
att gga agt ttg gtt agg gct aat gct cta agg aga gag att gag aag			1392
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys			
	450	455	460
ctt agt gtt taagaaacaa ataatgaggt ctatctcctt tcttcatctc			1441
Leu Ser Val			
	465		
tatctctctt tttttgtctg ttagtaatat atctacac			1479

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

<210> 8

<211> 467

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
 35 40 45

Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
 50 55 60

Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
 85 90 95

Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile
 100 105 110

Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile
 115 120 125

Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met
 130 135 140

Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro
 165 170 175

Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
 180 185 190

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
 195 200 205

Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys S r Ile Asp Ala
 210 215 220

WO 00/08169

PCT/EP99/05467

Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro
 225 230 235 240

Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
 245 250 255

Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
 260 265 270

His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
 275 280 285

Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
 290 295 300

Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
 305 310 315 320

Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
 325 330 335

Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
 340 345 350

Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
 355 360 365

Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
 370 375 380

Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
 385 390 395 400

Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
 405 410 415

Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
 420 425 430

Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
 435 440 445

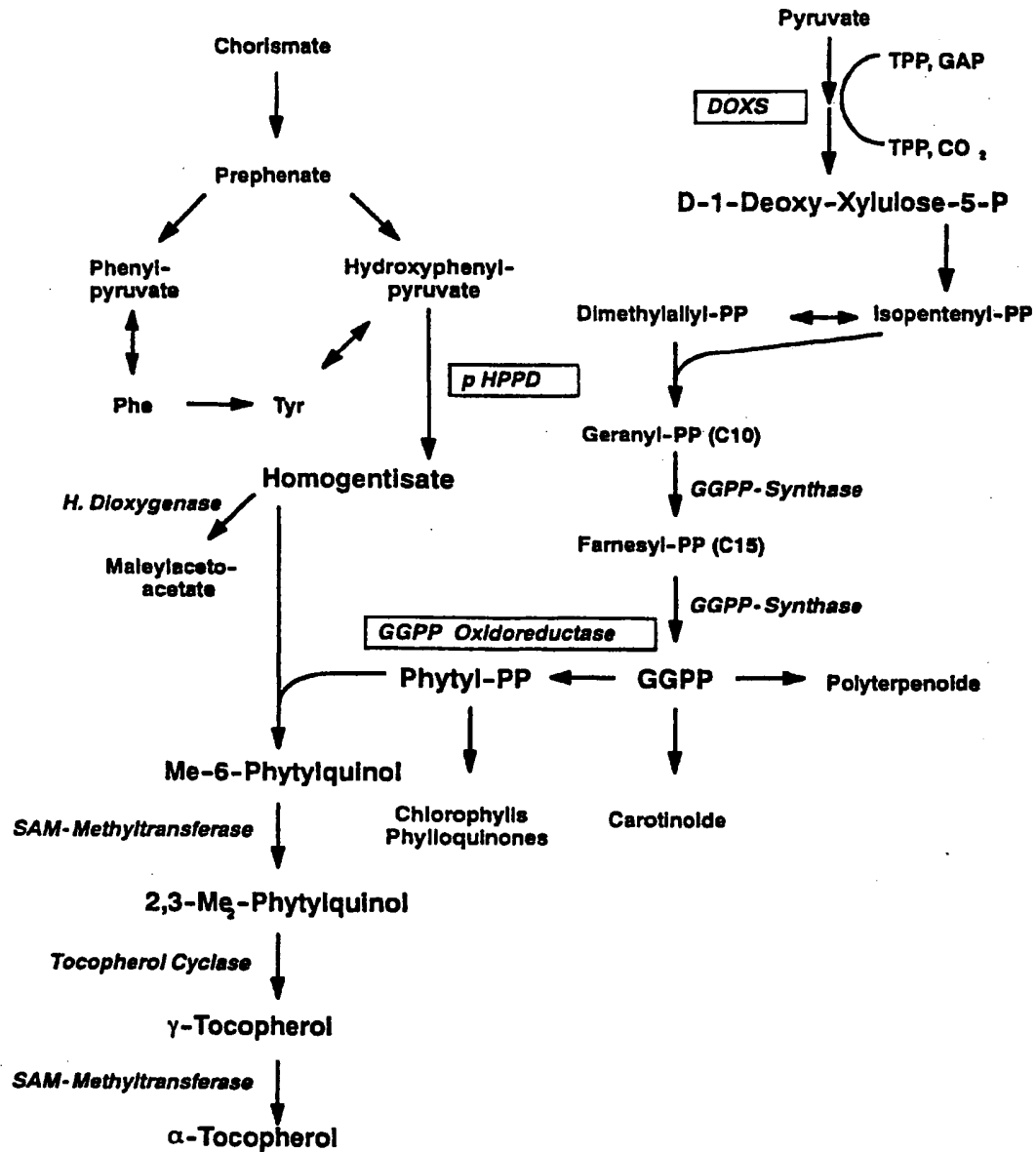
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
 450 455 460

Leu Ser Val
 465

0817/00006

1/NO TAG

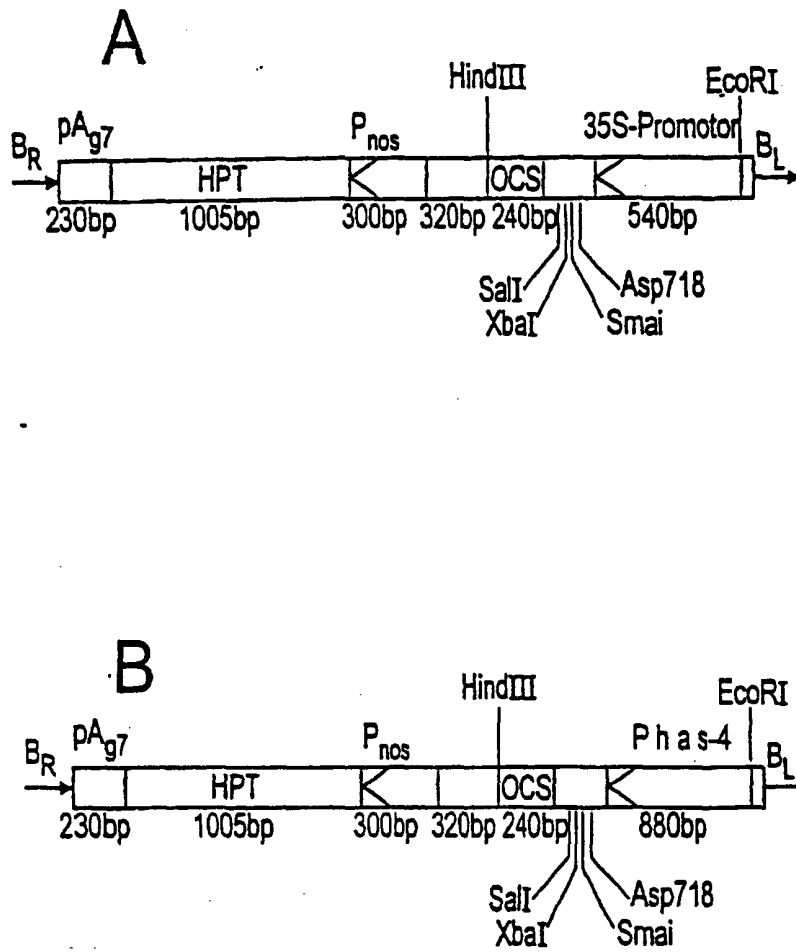
Figure 1



0817/00006

2/NO TAG

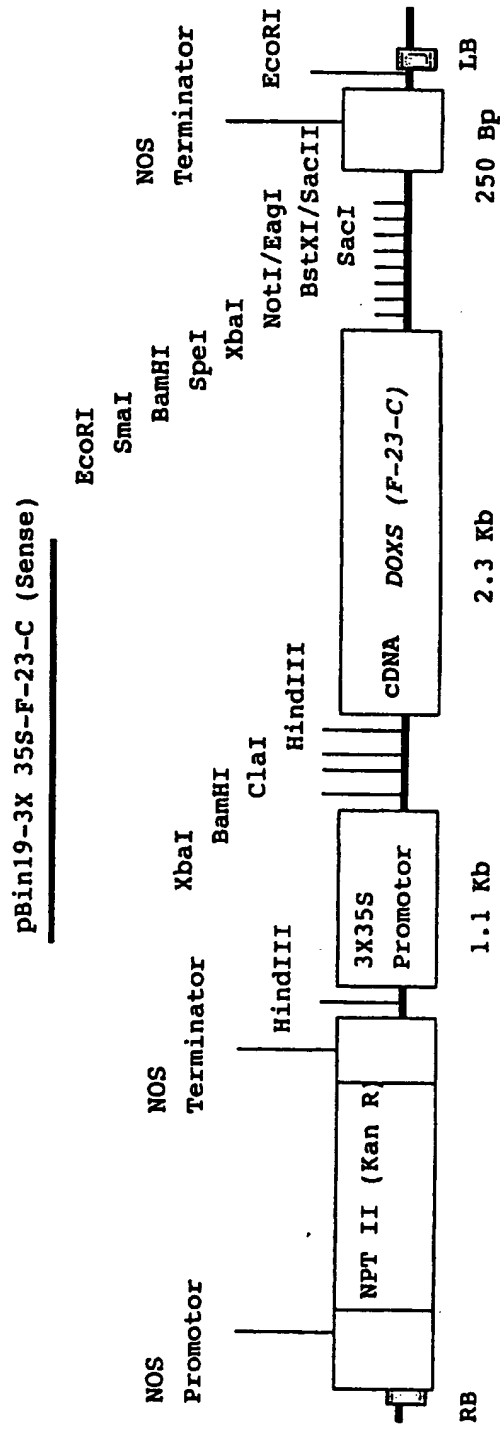
Figure 2



0817/00006

3/11

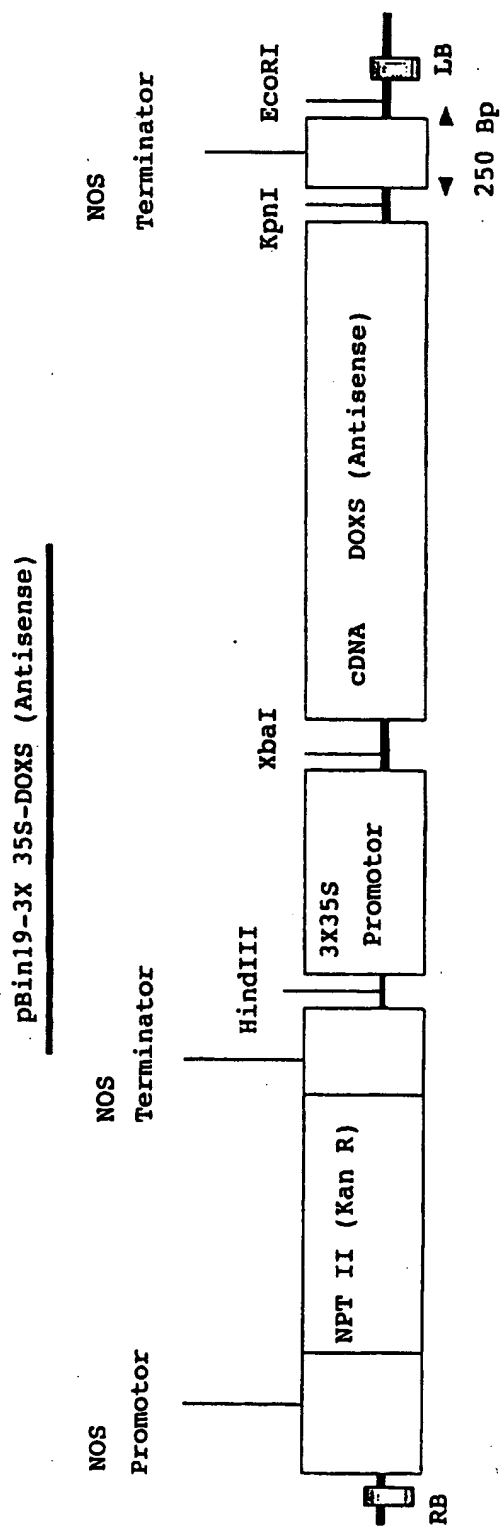
Figure 3



0817/00006

4/11

Figure 4



1/NO TAG

Figure 5

Binary vector for overexpression of the DOXS gene from *E. coli* in the cytosol of transgenic plants

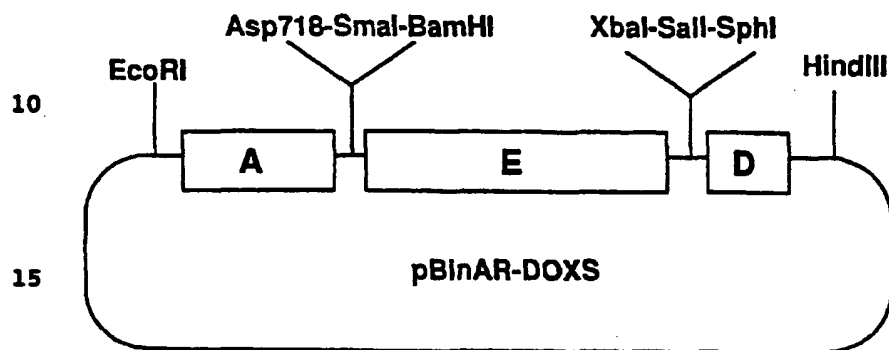
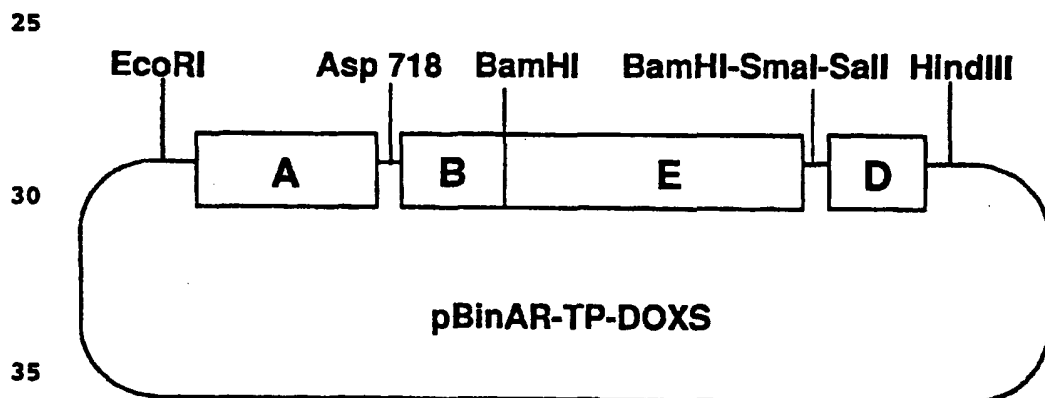


Figure 6

Binary vector for overexpression of the DOXS gene from *E. coli* in plastids of transgenic plants.



2/NO TAG

Figure 7: DOXS gene RNA expression 1 vel

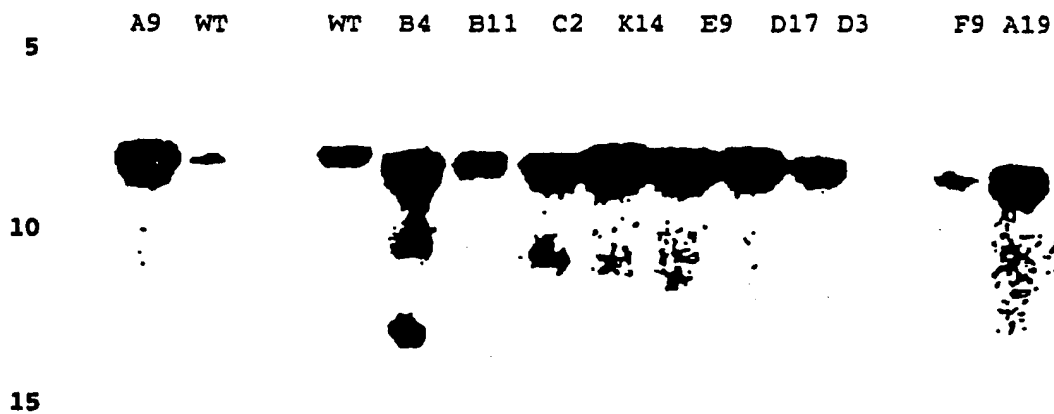
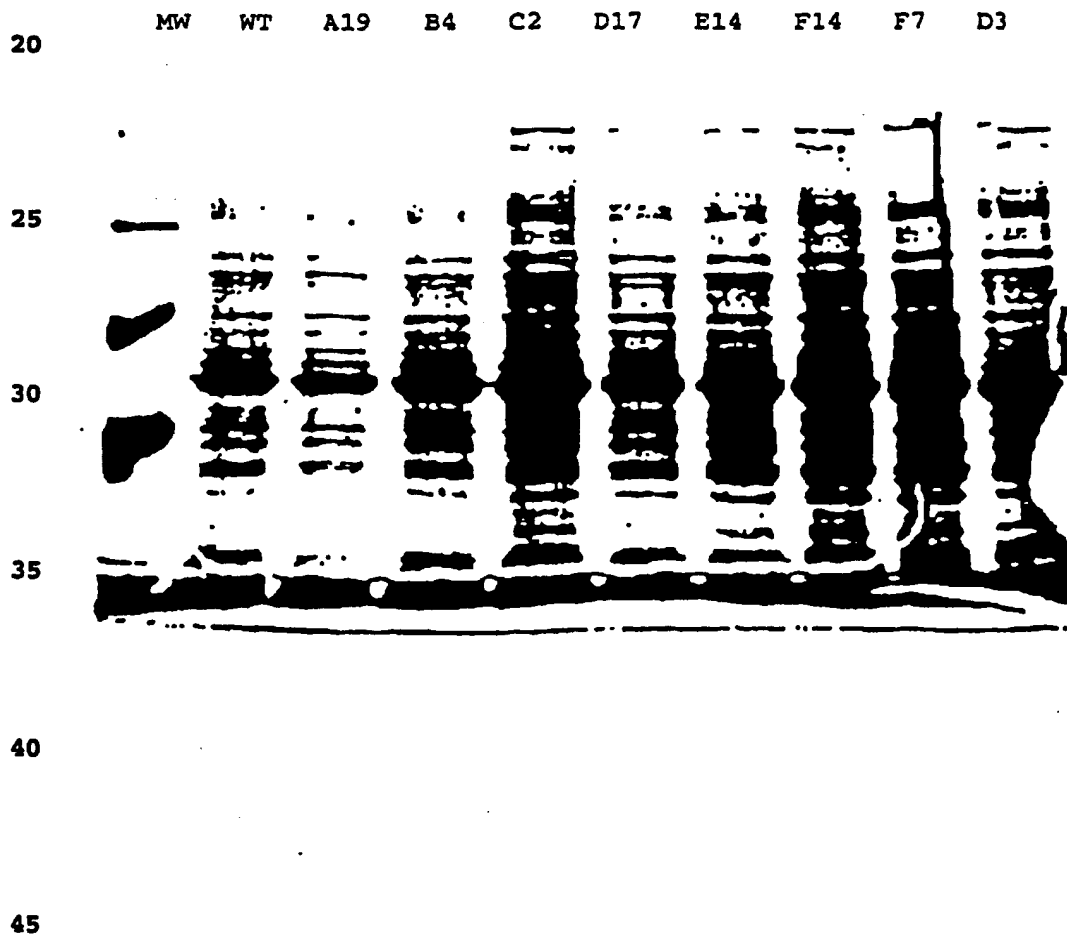


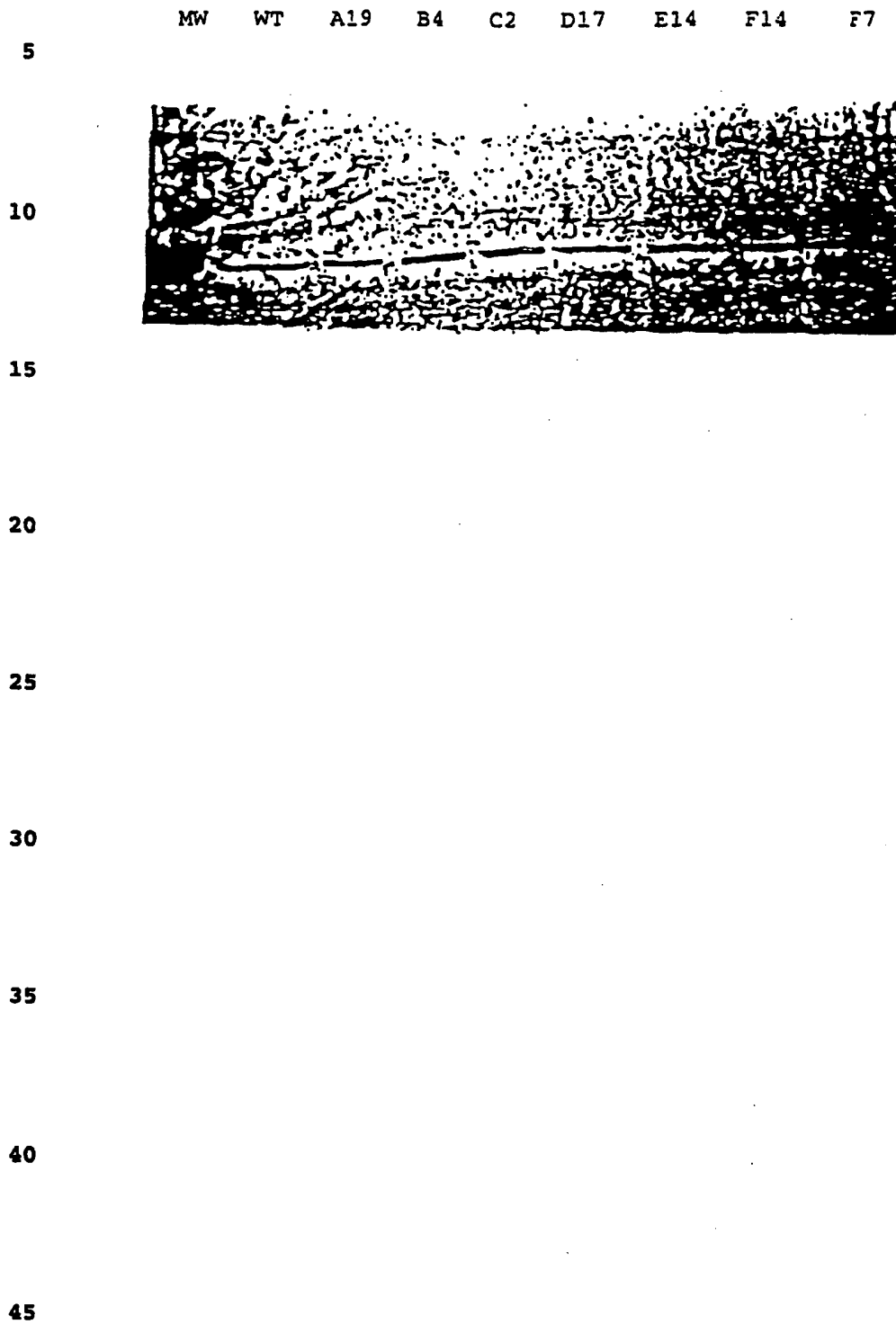
Figure 8: Amounts of protein in transgenic plants



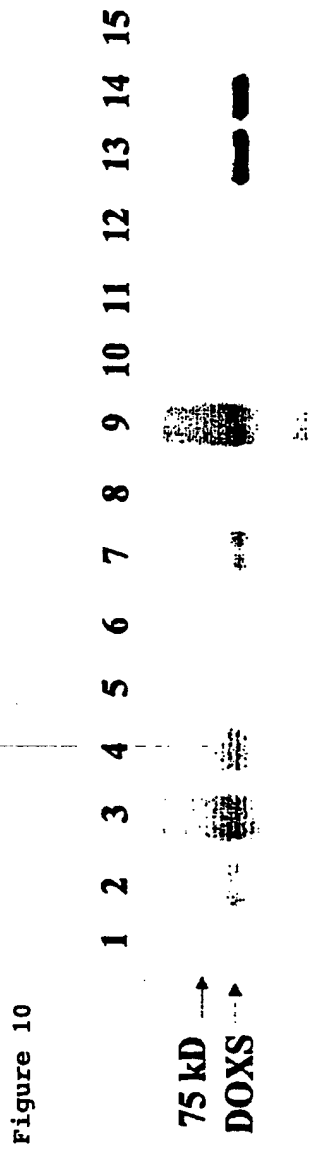
0817/00006

3/NO TAG

Figure 9: W stern analysis



0817/00006

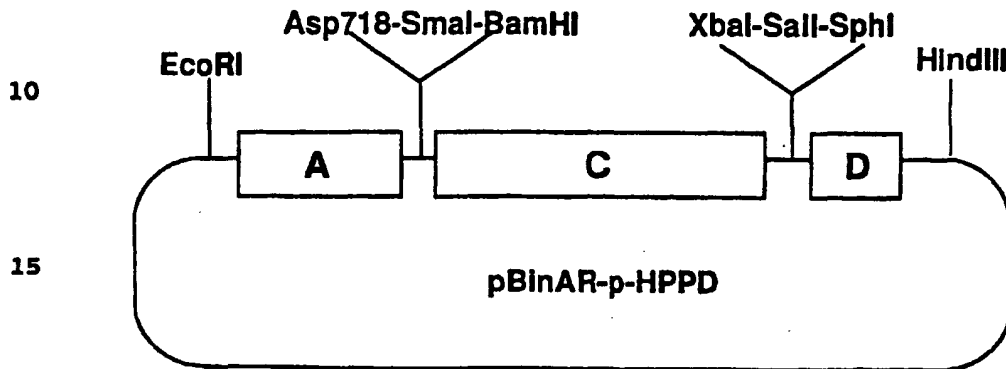


0817/00006

1

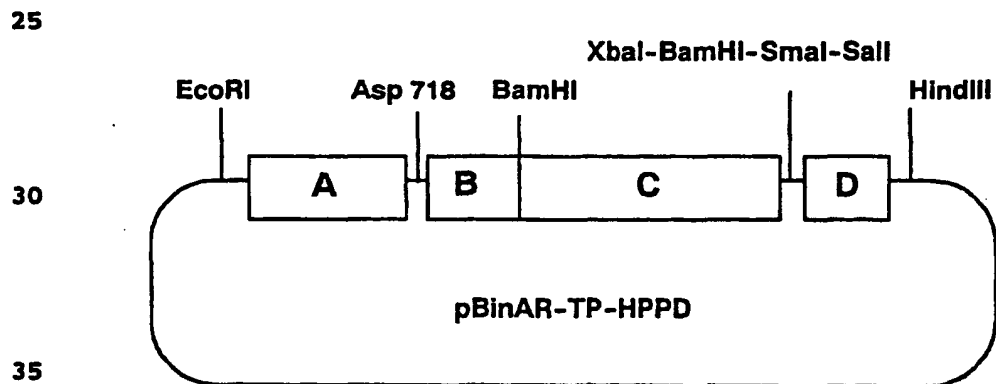
Figure 11

Binary vector for overexpression of the HPPD gene from
5 *Streptomyces avermitilis* in the cytosol of transgenic plants



20 Figure 12

Binary vector for overexpression of the HPPD gene from
25 *Streptomyces avermitilis* in plastids of transgenic plants

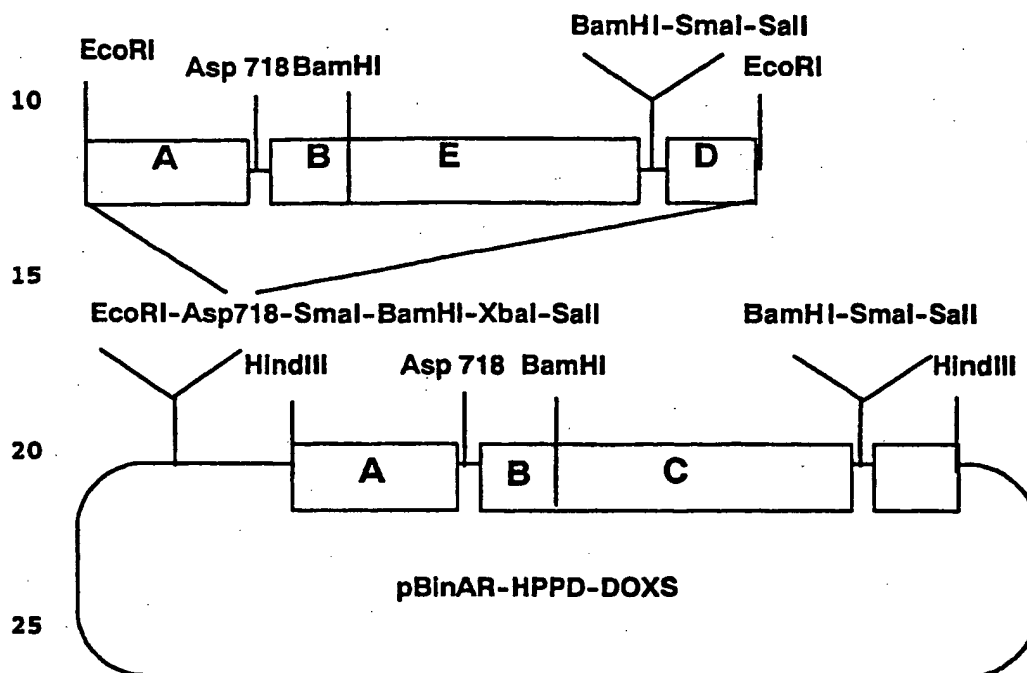


40

45

Figure 13

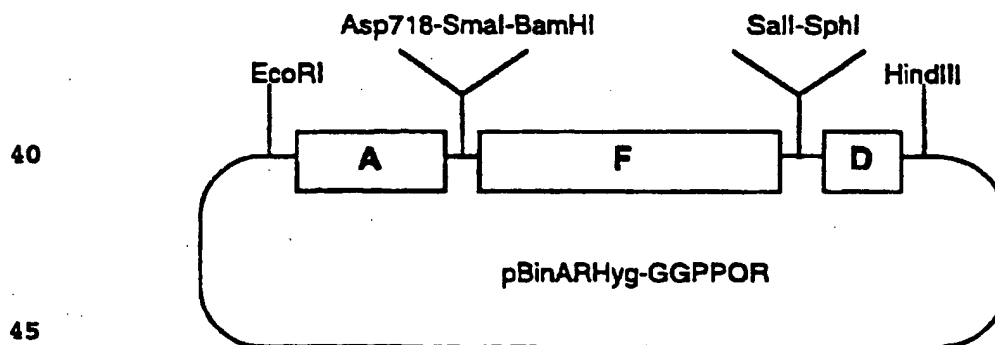
Binary vector for overexpression of the HPPD gene from *Streptomyces avermitilis* and the DOXS gene from *E.coli* in 5 plastids of transgenic plants.



30 Figure 14

Binary vector for overexpression of the GGPPOR gene from *Arabidopsis thaliana* in plastids of transgenic plants.

35

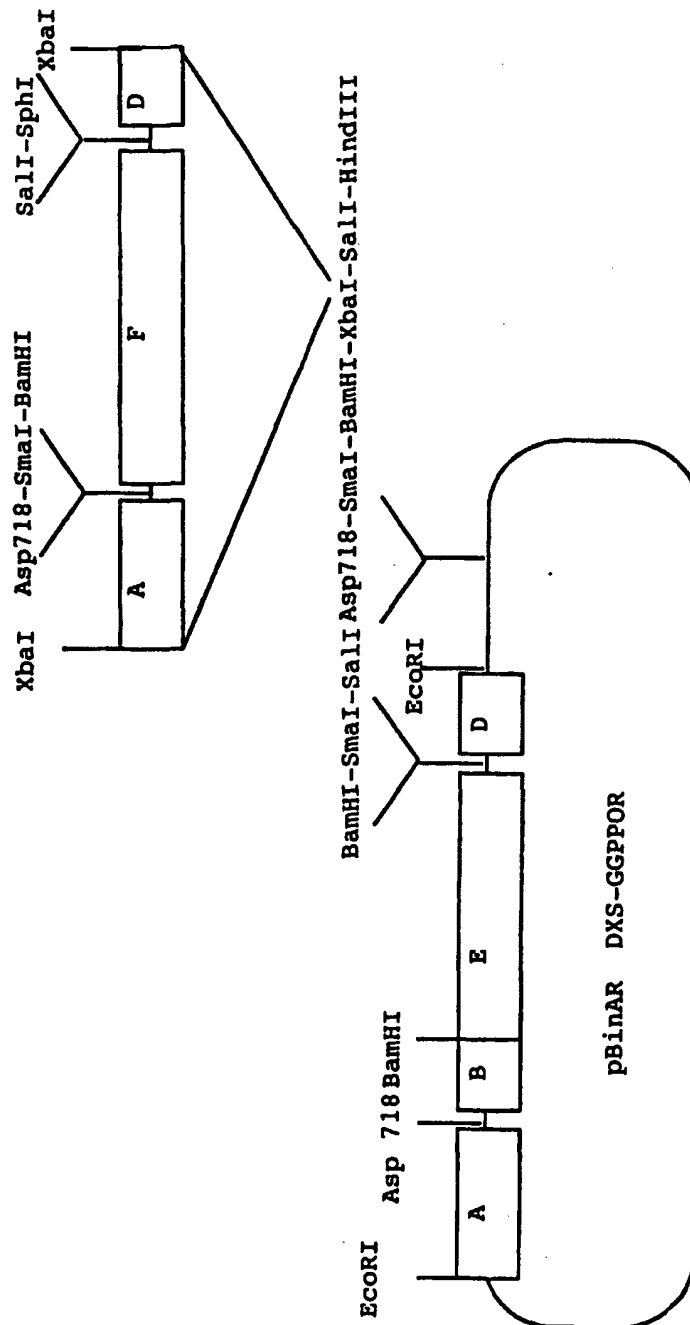


0817/00006

11a/11

Figure 15

Binary vector for overexpression of the GGPPOR gene from *Arabidopsis thaliana* and the DOXS gene from *E. coli* in plastids of transgenic plants

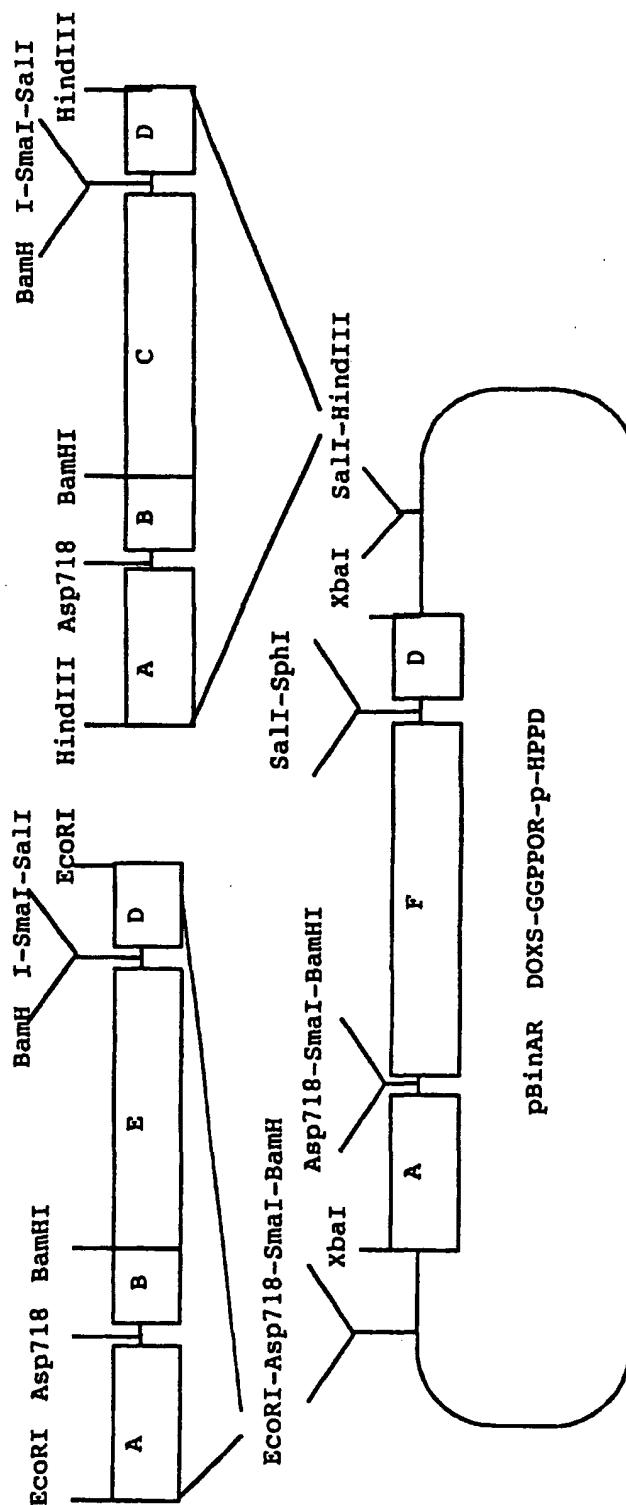


0817/00006

11b/11

Figure 16

Binary vector for overexpression of the DOXS gene from *E. coli*, the GPPOR gene from *Arabidopsis thaliana* and the HPPD gene from *Streptomyces avermitilis* in the plastids of transgenic plants



**BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSING THE DOXS-GENE FROM E. COLI,
THE GGPPOR GENE FROM ARABIDOPSIS THALIANA AND THE HPPD GENE
FROM STREPTOMYCES AVERMITILIS IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS**

